



TITLE:

プロテインキナーゼCの活性制御と
その生殖生理学的意義(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

枝重, 圭祐

CITATION:

枝重, 圭祐. プロテインキナーゼCの活性制御とその生殖生理学的意義.
京都大学, 1991, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1991-11-25

URL:

<https://doi.org/10.11501/3058492>

RIGHT:

新 制

農

611

京大附図

プロテインキナーゼCの活性制御と その生殖生理学的意義

1991

校 重 主 祐

プロテインキナーゼCの活性制御と その生殖生理学的意義

1991

枝重圭祐

目 次

緒 言	1
引用文献	8
第一章 Cキナーゼの活性化と基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用	
第一節 緒言	13
第二節 材料と方法	15
第三節 結果	20
第四節 考察	31
引用文献	36
第二章 TPAによる細胞の分化および増殖に対するCキナーゼ阻害物質の効果とその機構	
第一節 緒言	40
第二節 TPAによる前骨髄性白血病細胞HL-60の分化に対するCキナーゼ阻害物質の効果とその機構	43
第三節 TPAによる細胞増殖とCキナーゼの基質タンパク質と細胞膜との相互作用	56
第四節 まとめ	72
引用文献	74
第三章 非ステロイド系抗エストロゲン剤によるCキナーゼ活性の阻害とその機構	
第一節 緒言	81
第二節 材料と方法	83
第三節 結果	85

結 言

個体の発生、生殖腺細胞の増殖や機能分化、性成熟や性周期タイミングの調整といった現象は、さまざまな情報が、生体内で生産されるホルモンや増殖因子等の情報伝達物質を介して標的組織に伝えられることによって調整されている。それゆえその機構の解明は、生殖生理学において非常に興味深いテーマである。

ある種のペプチドホルモンや増殖因子による細胞外からの情報は、細胞膜に存在する受容体で受容され、セカンドメッセンジャーと呼ばれる物質の増大を介して細胞内に伝達される。このような伝達系には、細胞内cyclicAMPの上昇によって活性化されるcyclicAMP依存性タンパク質リン酸化酵素を介する系や、cyclicGMPの上昇によって活性化されるcyclicGMP依存性タンパク質リン酸化酵素を介する系や、細胞内 Ca^{2+} の上昇によって活性化される Ca^{2+} -カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素を介する系の他に、最近非常に注目されている膜リン脂質の代謝応答系と共役した Ca^{2+} -リン脂質依存性タンパク質リン酸化酵素(以下Cキナーゼと呼ぶ)を介した情報伝達系がある。

1953年にHokinらによって、アセチルコリンで細胞膜受容体を刺激すると、ホスファチジルイノシトールとホスファチジン酸へのリンの取込みが上昇することが見出され、これが刺激応答に伴う膜リン脂質代謝の変化の最初の報告となった[1]。その後一時精力的な研究が行われた時期もあったが、その生理学的意義はしばらくまったく不明であった。1975年Michellは、イノシトールリン脂質代謝の亢進が細胞内 Ca^{2+} の上昇に関与するという仮説を発表した[2]。その後1980年代に入り重要な発見が相次いだ。1983年Berridgeらは、ホスホリパーゼCによる

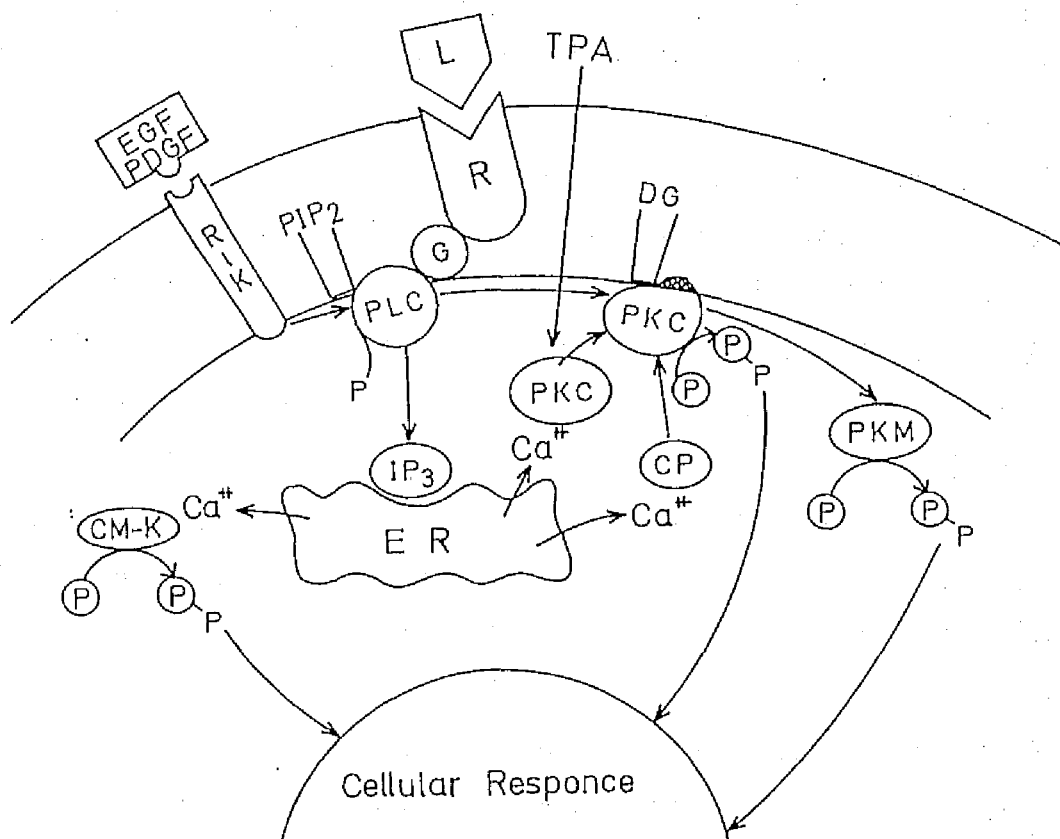
ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸(以下 PIP_2 と呼ぶ)の加水分解物であるイノシトール-1,4,5-3リン酸(以下 IP_3 と呼ぶ)が、細胞内 Ca^{2+} プールより Ca^{2+} を動員することを見出した[3]。一方Nishizukaらは、 PIP_2 のもう一つの分解物であるジアシルグリセロール(以下DGと呼ぶ)がCキナーゼの Ca^{2+} 要求性を著しく減少させ、生理的条件下の Ca^{2+} 濃度でこれを活性化することを見出した[4,5]。Cキナーゼは、1977年にNishizukaらのグループによって、分解を受けて活性化されるタンパク質リン酸化酵素として見出され、後に 10^{-8} Mの Ca^{2+} と酸性リン脂質存在下に活性化することが判明した[6,7]。以上のように、ある種のホルモンや増殖因子がイノシトールリン脂質代謝を亢進させ、それがCキナーゼを介する情報伝達と結びついていることが明らかとなった。その後、Castagnaらによって強力な発癌プロモーターのひとつで種々の細胞に対して多彩な作用を有する12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate(以下TPAと呼ぶ)がCキナーゼを活性化することが報告され、TPAの細胞内の標的がCキナーゼであることが判明し、Cキナーゼがさまざまな細胞機能発現に重要な役割を果たしていることが明白となった[8,9]。

現在までに、Cキナーゼを介した情報伝達が関与すると示唆されている生殖生理学的現象には、以下のようなものが報告されている。発生・分化に関しては、Winkelらは4細胞期のマウス胚をTPAで処理すると一過性のCompactionが起こることを見出し、CompactionにCキナーゼが関与することを示唆した[10]。

またOtteらによって、アフリカツメガエルの神経溝の誘導時にCキナーゼが細胞膜に移行し、しかもTPAによっても神経溝の誘導が起こることが報告されている[11]。性周期に関しては、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(以下Gn-RHと呼ぶ)は培養脳下

垂体前葉細胞のイノシトールリン脂質の代謝回転を亢進させ、またTPAはこの細胞からの黄体形成ホルモン(以下LHと呼ぶ)の分泌を引き起こすことが報告されている[12-21]。またGn-RHは、顆粒膜細胞のイノシトールリン脂質の代謝を亢進させ、TPAと同様にエストロゲンの分泌を抑制することが報告されている[22,23]。また強力な黄体退縮作用のあるプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ が、黄体細胞のイノシトールリン脂質の代謝回転を亢進することから、その作用にCキナーゼの活性化が関与しているものと考えられている[24-27]。またウニの未受精卵に、 IP_3 やその他のイノシトールリン脂質代謝物をマイクロインジェクションすることによって、細胞内 Ca^{2+} の増大と共に、受精に伴って形成される卵膜が形成されることも知られている[28-30]。受精に伴う細胞内 Ca^{2+} の増大は、シリアンハムスターのような哺乳動物でも確認されており[31]、受精時に起こる種々の現象に、イノシトールリン脂質代謝やCキナーゼの活性化が関与している可能性が示唆されている。以上のようにCキナーゼは、発生や性周期や生殖細胞の機能発現等さまざまな生殖生理現象に関与していることが示唆されている。

図にCキナーゼの活性化を介した情報伝達を模式的に示す。ある種の情報伝達物質が細胞膜上の受容体に結合すると、GTP結合タンパク質を介してホスホリパーゼCが活性化される。ホスホリパーゼCは PIP_2 を分解し、DGと IP_3 が生成される。この代謝産物のうち、可溶性の IP_3 が細胞内の小胞体からの Ca^{2+} を放出させることによって細胞内 Ca^{2+} を上昇させる。この Ca^{2+} の上昇は、 Ca^{2+} -カルモジュリン依存性タンパクリン酸化酵素を活性化すると共にCキナーゼを細胞膜に移行させる。一方DGはCキナーゼの Ca^{2+} 要求性を著しく減少させることによって活性化させる。TPAは細胞内のCキナーゼに直接結合し、細胞膜に



Schematic model of activation of protein kinase C. L, inositol break down inducible legand; R, inositol break down inducible legand receptor; G, GTP binding protein; EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet derived growth factor; R-K, receptor kinase of EGF or PDGF; PLC, phospholipase C; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; IP₃, inositol-1,4,5-triphosphate; DG, diacylglycerol; ER, endoplasmic reticulum; PKC, protein kinase C; CP, calpain; PKM, protein kinase M; CM-K, Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase; P, substrate protein; P-P, phosphorylated substrate protein.

移行させてこれを活性化する。活性化したCキナーゼは、基質タンパク質をリン酸化することによって情報を細胞内に伝達し、それによって細胞の増殖や分化等さまざまな細胞機能が発現する。また細胞内 Ca^{2+} の上昇は、 Ca^{2+} 依存性タンパク質分解酵素であるカルパインを活性化する。細胞内 Ca^{2+} の上昇によりカルパインは細胞膜に移行して活性化し、細胞膜に結合したCキナーゼを優先的に分解し、Cキナーゼの触媒部位を細胞質に切り出す(Mキナーゼ)。Mキナーゼはもはやcofactorを要求せず、常時リン酸化活性を有している。上皮成長因子(以下EGFと呼ぶ)や血小板由来成長因子(以下PDGFと呼ぶ)は、その受容体を介してホスホリパーゼC γ をリン酸化することによってこれを活性化し、Cキナーゼを活性化させる。このようにして細胞内に伝えられた情報によって種々の細胞機能が発現する。

Ca^{2+} やDGやTPAによって活性化されたCキナーゼが細胞膜に局在することは、その基質タンパク質も細胞膜ないしはその近傍に存在することが望ましいと容易に想像される。事実発癌遺伝子産物のひとつであるp60^{src}のCキナーゼによるリン酸化には、p60^{src}にミリスチン酸が結合して細胞膜への結合性を獲得する必要があると示唆されている[32]。また Ca^{2+} 依存性リン脂質膜結合タンパク質であるAnnexin IのCキナーゼによるリン酸化にも、 Ca^{2+} に依存したリン脂質膜への結合が必要であることが示唆されている[33,34]。一方カルパインによって切り出されたMキナーゼは細胞質に局在するため、膜結合Cキナーゼとは基質タンパク質が違っていることが容易に推察される。これらの報告は、Cキナーゼを介した情報伝達系は単にCキナーゼの活性化のみで制御されているのではなく、基質タンパク質の合成後の修飾や、細胞の刺激応答に伴う細胞内 Ca^{2+} の上昇等細胞内環境の変化による基質タンパク質の細胞内動態や、Cキ

ナーゼの分解等によっても制御されていることを示唆している。

そこで本研究では、Cキナーゼの活性化に伴う細胞膜への移行に着目し、Cキナーゼによる情報伝達機構を、細胞膜と細胞質タンパク質の相互作用の観点から考察し、その生殖生理に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

第一章ではCキナーゼの活性化における基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用の意義について検討した。人工リン脂質膜を細胞膜のモデルとし、精製Cキナーゼを使って、既知の可溶性基質タンパク質のリン脂質膜への結合量とそのリン酸化との相関を詳細に検討した。また同様な相互作用について細胞膜受容体型タンパク質リン酸化酵素のひとつである上皮成長因子受容体タンパク質リン酸化酵素(以下EGF受容体キナーゼと呼ぶ)でも検討した。以下これらの結果をもとに種々の解析を行った。

Cキナーゼの活性化物質であるTPAは、種々の細胞を分化させたり、単独または他の因子と共同して細胞増殖を起こすことから、細胞の分化や増殖にCキナーゼが深く関与していることが示唆されている。第二章では、TPAによる細胞分化のモデルとして最もよく研究されている前骨髄性白血病細胞 HL-60のTPAによる分化と、細胞増殖のモデルとして皮膚二段階発癌におけるTPAの発癌プロモーション作用に対するCキナーゼ阻害物質の阻害効果について検討した。そしてその作用機序について、Cキナーゼの細胞膜への移行と基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用を中心に解析を試みた。

現在汎用されている薬物の中に強いCキナーゼ阻害活性を有するものがある。ClomipheneやTamoxifenといったトリフェニルアクリロニトリル誘導体は、その構造の類似性からエストロゲンと拮抗してエストロゲンの受容体への結合を阻害すること

から、非ステロイド系抗エストロゲン剤として乳癌の治療や不妊の治療よく使用されている。またその高い排卵誘発効果と安全性により、ヒト体外受精における過排卵誘起にもよく使用されている。最近この物質にCキナーゼ阻害作用があることが見出され、その薬理作用とCキナーゼ阻害作用との関係が注目されている。第三章ではこの非ステロイド系抗エストロゲン剤によるCキナーゼ阻害作用とその機構について、特に基質タンパク質と細胞膜との相互作用の観点から検討した。

引用文献

1. Hokin, N.R., and Hokin, L.E. Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipides of pancreas slices. J. Biol. Chem. 203:967-977, 1953.
2. Michell, R.H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. Biochem. Biophys. Acta, 415:81-147, 1975.
3. Berridge, M.J., and Irvine, R.F. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature, 312: 315-320, 1984.
4. Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature, 308:693-698, 1984.
5. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91:1218-1224, 1979.
6. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., and Nishizuka, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. J. Biol. Chem. 252:7603-7609, 1977.
7. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. J. Biol. Chem. 254:3692-3695, 1979.
8. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumour-promoting phorbol esters.

- J. Biol. Chem. 257:7847-7851, 1982.
9. Niedel, J.E., Kuhn, L.J., and Vandenbark, G.R. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:36-40, 1983.
10. Winkel, G.K., Ferguson, J.E., Takeichi, M., and Nuccitelli, R. Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. Develop. Biol. 138:1-15, 1990.
11. Otte, A.P., Koster, C.H., Snoek, G.T., and Durston A.J. Protein kinase C mediates neural induction in *Xenopus laevis*. Nature, 334:618-620, 1988.
12. Kiesel, L., and Catt, K.J. Phosphatidic acid and the calcium-dependent actions of gonadotropin-releasing hormone in pituitary gonadotrophs. Arch. Biochem. Biophys. 231:202-210, 1984.
13. Andrews, W.V., and Conn, P.M. Gonadotropin-releasing hormone stimulates mass changes in phosphoinositides and diacylglycerol accumulation in purified gonadotrope cell cultures. Endocrinology, 118:1148-1158, 1986.
14. Naor, Z., Zer, J., Zakut, H., and Hermon, J. Characterization of pituitary calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase: redistribution by gonadotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:8203-8207, 1985.
15. Hirota, K., Hirota, T., Aguilera, G., and Catt, K.J. Hormone-induced redistribution of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in pituitary gonadotrophs. J. Biol. Chem. 260:3243-3246, 1985.

16. Conn, P.M., Ganong, B.R., Ebeling, J., Staley, D., Niedel, J., and Bell, R.M. Diacylglycerols release LH: Structure-activity relations and protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126:532-539, 1985.
17. Naor, Z., and Eli, Y. Synergistic stimulation of luteinizing hormone (LH) by protein kinase C activators and Ca^{2+} ionophore. Biochem. Biophys. Res. Commun. 130:848-853, 1985.
18. Negro-Vilar, A., and Lapetina, E.G. 1,2-Didecanoyl glycerol and phorbol 12,13-dibutyrate enhance anterior pituitary hormone secretion in vitro. Endocrinology, 117:1559-1564, 1985.
19. Turgeon, J.L., and Waring, D.W. Modification of luteinizing hormone secretion by activators of Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase. Endocrinology, 118:2053-2058, 1986.
20. Minegishi, T., and Leung, P.C.K. Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates arachidonic acid release in rat granulosa cell. Endocrinology, 117:2001-2007, 1985.
21. Leung, P.C.K., Raymond, V., and Labrie, F. Stimulation of phosphatidic acid and phosphatidylinositol labeling in luteal cells by luteinizing hormone releasing hormone. Endocrinology, 112:1138-1140, 1983.
22. Shinohara, O., Knecht, M., and Catt, K. Inhibition of gonadotropin-induced granulosa cell differentiation by activation of protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:8518-8522, 1985.
23. Welsh, T.H., Jr., Jones, P.B.C., and Hsueh, A.J.W. Phorbol ester inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis in vitro.

Cancer Res. 44:885-892, 1984.

24. Leung, P.C.K., Minegishi, T., Ma, F., Zhou, F., and Ho-Yuen, B. Induction of polyphosphoinositide breakdown in rat corpus luteum by prostaglandin $F_{2\alpha}$. Endocrinology, 119:12-18, 1986.
25. Davis, J.S., Weakland, L.L., Weiland, D.A., Farese, R.V., and West, L.A. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ stimulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and mobilizes intracellular Ca^{2+} in bovine luteal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:3728-3732, 1987.
26. Sender Baum, M., and Rosberg, S. A phorbol ester, phorbol 12-myristate 13-acetate, and a calcium ionophore, A23187, can mimic the luteolytic effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in isolated rat luteal cells. Endocrinology, 120:1019-1026, 1987.
27. Sender Baum. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ administered in vivo induces Ca^{2+} -independent protein phosphorylation in rat luteal tissue. Endocrinology, 124:555-557, 1989.
28. Slack, B.E., Bell, J.E., and Benos, D.J. Inositol-1,4,5-triphosphate injection mimics fertilization potentials in sea urchin eggs. Am. J. Physiol. 250:C340-C344.
29. Turner, P.R., Jaffe, L.A., and Fein, A. Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1,4,5-triphosphate and GTP-binding protein. J. Cell. Biol. 102:70-76, 1986.
30. Whittaker, M., and Irvine, R.F. Inositol 1,4,5-triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. Nature. 312:636-639, 1984.
31. Miyazaki, S., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y., and

- Hiramoto, Y. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. Develop. Biol. 118:259-267, 1986.
32. Buss, J.E., Kemps, M.P., Gould, K., and Sefton, B.M. The absence of myristic acid decreases membrane binding of p60^{src} but does not affect tyrosine protein kinase activity. J. Virol. 58:468-474, 1986.
33. Shlaepfer, D.D., and Haigler, H.T. Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. J. Biol. Chem. 262:6931-6937. 1987.
34. Sato, E.F., Tanaka, Y., Edashige, K., Kobuchi, H., Morishita, S., Sugino, Y.M., Inoue, M., and Utsumi, K. Expression of cDNA encoding lipocortin-like 39 kDa protein of guinea pig neutrophils in yeast. FEBS Lett. 255:231-236. 1989.

第一章 Cキナーゼの活性化と基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用

第一節 緒言

ある種の細胞外からの情報によってホスホリパーゼCが活性化し、細胞膜のPI-P₂が分解され、IP₃とDGが生成する。Cキナーゼはこれらの生成物によって細胞膜に移行し活性化する。CキナーゼはTPAなどの発癌プロモーターによっても細胞膜に移行し、活性化される[1]。特にTPAなどによって持続的な活性化を受けた場合、その後カルパインなどのCa²⁺依存性タンパク質分解酵素によって触媒領域が細胞質に切り出される。この部分分解されたMキナーゼは、Ca²⁺やPS等を要求することなく常にリン酸化活性を有している[2-4]。DGやTPAによって活性化したCキナーゼが細胞膜に局在し、その後切り出されるMキナーゼは細胞質に局在することは、この二つの活性化形態で基質タンパク質が異なることが想像される。基質タンパク質のリン酸化自体がCキナーゼの情報伝達手段であるため、基質タンパク質の解析は、Cキナーゼを介する情報伝達機構を解明する上で非常に重要である。

ガン遺伝子産物のひとつであり、*in vitro*でCキナーゼの基質となるp60^{src}は、ミリスチン酸を介して細胞膜に結合しているが、ミリスチン酸の結合部位のアミノ酸を置換してその結合能を失わせると、細胞を変異させる能力を失うと同時にCキナーゼによるリン酸化を受けなくなることが知られている[5-7]。またCa²⁺依存性膜結合タンパク質のひとつであるAnnexin Iは、Cキナーゼによってリン酸化を受けるが、そのリン酸化にはCa²⁺によるリン脂質膜への結合が必要であることが示唆されて

いる [8,9]。これらの結果から、細胞膜に結合している C キナーゼによるリン酸化には、基質タンパク質が細胞膜に結合している必要があると推察される。しかし C キナーゼ活性測定によく用いられている Histone は、一般に膜結合タンパクと考えられていない可溶性タンパク質であるため、基質タンパク質の膜結合は必ずしも必要とは考えられていなかった。Bazzy らは、Histone が Triton X-100 と Phosphatidylserine (以下 PS と呼ぶ) の混合ミセルや egg phosphatidylcholine (以下 egg PC と呼ぶ) と PS からなるリン脂質膜を凝集させ、大きな凝集塊を形成することを報告し、可溶性タンパク質である Histone が PS を介してリン脂質膜と相互作用することを示した [10]。この報告は、C キナーゼの活性測定で用いられる Histone も、リン脂質膜と結合してリン酸化されている可能性を示唆している。

そこで、C キナーゼによるリン酸化における基質タンパク質の膜結合の必要性についてより詳細に検討した。細胞膜のモデルとして Dipalmitoyl phosphatidylcholine (以下 DPPC と呼ぶ) をベースにした人工リン脂質膜を用い、基質タンパク質としては、C キナーゼの基質として最もよく使用されている Histone type IIIS と、 Ca^{2+} と PS に依存してリン脂質膜と結合する細胞質タンパク質の一種である Annexin 1、および化学修飾によりミリスチン酸をエステル結合させてリン脂質膜との親和性を持たせたミリスチン酸化リゾチーム (以下 C₁₄-lysozyme と呼ぶ) を使用した。そしてそれぞれの膜結合量および C キナーゼによるリン酸化に対する Ca^{2+} とイオン強度の効果から、C キナーゼによるリン酸化における基質タンパク質の細胞膜結合の必要性を検討した。

第 二 節 材 料 と 方 法

試 薬

Diiolein(以下 DO と呼ぶ)、Dipalmitoyl phosphatidylcholine、Histone type IIIS、Phenylmethylsulfonyl fluoride(以下 PMSF と呼ぶ)は Sigma 社のものを、Ficoll 400 および 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate は Pharmacia 社より、DEAE cellulose(以下 DE-52 と呼ぶ)と Glass filter (GF/C) は Watman 社より、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は ICN Radiochemical 社より購入したものを使用した。Bovine brain phosphatidylserine は Avanti Polar Lipid 社、Leupeptin は ペプチド研究所、シンチレーター は NEN 社の ACSII を使用した。Annexin I は、モルモット Annexin I を酵母に発現させた組み換え Annexin I を高知医科大学医学部生物学教室の佐藤英介博士より分与を受けた。また Cathepsin-L は、山口大学農学部農芸化学科生物化学教室の内海俊彦博士より分与を受けた。その他の試薬はナカライテスクの特級試薬を使用した。

C キナーゼの調整

C キナーゼは、250-300g の Wistar 系ラット脳より Utsumi らの方法により部分精製したものを使用した [11, 12]。すなわちラット脳を 0.25 M ショ糖、5 mM EGTA、2 mM EDTA、2 mM PMSF、0.01 % Leupeptin、10 mM β -mercaptoethanol、0.1 % Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl (pH. 7.5) 緩衝液中でポッターエルベジューム型ホモジナイザーでホモジナイズし、100,000 x g で 60 分間遠心分離した。この上清を 0.5 mM EDTA、0.5 mM EGTA、10 mM β -mercaptoethanol、2 mM PMSF を含む 20 mM Tris-HCl (pH. 7.5) 緩衝液で予め平衡状態にした DE-52 (0.7 x 7 cm)

のカラム にかき、30 mMから100 mM NaClで溶出した分画を回収した。更に100 mM NaCl、1 mM EGTA、10 mM β -mercapto-ethanolを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)緩衝液で平衡化した TSKG-3000SWでゲル濾過を行い、活性分画を部分精製Cキナーゼとして使用した。なおすべての操作は4°Cで行った。

EGF受容体キナーゼの調整

EGF受容体キナーゼは、A431細胞の細胞膜分画を酵素標品として使用した[13]。すなわち、卵巣癌由来のヒト上皮性腫瘍細胞であるA431を、10%ウシ胎仔血清(以下FCSと呼ぶ)を含むダルベッコ改良イーグル培養液(DMEM)で75 cm²培養フラスコを用いて培養し、コンフルエントなるまで培養した。DMEM(-FCS)で2回洗滌後、0.2 μ g/mlのEGFを含むDMEM(-FCS)で1時間培養して、EGF受容体キナーゼを活性化した。そして氷冷低張液(10 mM HEPES (pH 7.5), 0.5 mM MgCl)で2回洗滌後、0°Cで30分間低張液で処理し、細胞を破壊した。培養フラスコに張りついている細胞膜をピペッティングで剥離し、1 mM EGTAを含む10 mM HEPES (pH 7.5)緩衝液中でテフロンホモジナイザーで20往復してホモジネートし、10,000 x gで5分間遠心してその沈渣を酵素標品とした。

Cキナーゼ活性の測定

Boniらの方法を一部改変して行った[14,15]。反応液は250 μ lとし、それぞれの最終濃度は、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM Mg acetate、10 μ M (30 Ci/mmol) [γ -³²P]ATP、0.3 mM CaCl₂ないしは1mM EGTA、1 mM リン脂質膜 (DPPCのみ、ないしはDPPC/PS = 4/1)、100 nM TPAないしは50 μ M DOとした。反応は、ATPを入れることで開始し、30°Cで5分間行った後、

1 mlの氷冷25%トリクロロ酢酸を添加して停止させた。15分以上氷中の静置してタンパク質を沈殿させた後、Glass filter (GF/C filter)上に沈殿したタンパク質を回収し、5%トリクロロ酢酸および2%ピロリン酸を含む溶液で4回洗滌し、乾燥させた。Glass filterをバイアル瓶に入れ、シンチレーターを添加し、放射活性を液体シンチレーションカウンターにて計測した。

一部の実験では、タンパク質を上記の条件でリン酸化した後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(以下SDS-PAGEと呼ぶ)サンプル調整用緩衝液を添加して反応を停止させた。100 °Cで3分処理した後、Laemmli法に従ってSDS-PAGEを行い、銀染色によりタンパク質を検出し、更にリン酸化タンパク質はオートラジオグラフィーにより検出した。それぞれ600 nmでの吸光度をデンシドメーターで測定することによって、タンパク質量とリン酸化量を決定した。

EGF受容体キナーゼ活性の測定

リン酸化酵素としてのA431の膜分画(5-40 μ gのタンパク質量)、200 μ g/ml Annexin 1、20 mM HEPES (pH 7.4)、2 mM $MgCl_2$ 、10 μ M Na-O-Vanadate、2 μ g/ml EGF、 $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ATP (20 μ M; 2-3 μ Ci)およびさまざまな濃度の Ca^{2+} を含む反応液中で反応させた[13]。コントロールは、EGFで活性化しなかった細胞膜を用い、反応液のEGFも除いて行った。反応は、ATPの添加によって開始し、0 °Cで5分間行った。反応は等量のSDS-PAGEサンプル調整用緩衝液を添加して停止させた。100 °Cで3分間熱処理後、Laemmliの方法に従ってSDS-PAGEを行い、クーマシーブリリアントブルー染色(以下CBB染色と呼ぶ)して乾燥後、オートラジオグラフィーに供した。そして染色像とX線フィル

ムを600 nmでの吸光度で測定することによって、タンパク量とリン酸化量を決定した。

オートラジオグラフィー

オートラジオグラフィーは、各サンプルをSDS-PAGEした後、染色・乾燥させ、Kodak ORMAT filmと増感紙 (Dupont, Lighting plus)とともにカセットに挟んで -80 °Cで感光させた。

リン脂質膜の調整

リン脂質膜は、以下のようにして調整した[16]。Cloroform/Methanol=3/1に溶解したリン脂質を50°C減圧下でフィルム状に蒸発乾固した後、100 mM NaClを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5)緩衝液に分散させた。そして50 °Cで温浴し、窒素ガス気流下で、超音波細胞破碎装置 (Branson Sonifire Model 185) にて超音波処理を45分間行った。そして、10,000 x gで5分間遠心して上澄み分画をリン脂質膜として使用した。

タンパク質のリン脂質膜への結合

リン脂質膜へのタンパク質の結合性については、人工リン脂質膜を使用した場合はfloatation法を用いた。またA431膜分画を使用した場合は遠心法を用いた。

1. flotation法

flotation法は、Utsumiらの方法を一部改変して行った[16]。すなわち、1 mM リン脂質膜と基質タンパク質を、10 mM Mg acetate、およびさまざまな濃度のCa²⁺を含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5)緩衝液中で反応させた。反応後、当量の密度1.12のFicoll400液(10 mM Mg acetate, 反応液と同濃度のCa²⁺を含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5)緩衝液に溶解)を加え、上に密度1.05

と密度1.01のFicoll400液(0.3 mM Ca^{2+} を含むTris-HCl(pH 7.5)緩衝液、なお Ca^{2+} を含まない系は1 mM EGTAを添加)を重層し、0°Cで100,000 x gで1時間遠心し、浮上してきたリン脂質膜分画と底に止まっている分画を回収し、それぞれリン脂質膜結合分画と非結合分画とした。そして回収物と当量のSDS-PAGEサンプル調整用緩衝液を加え、100°Cで3分間熱処理した後、SDS-PAGEを行い、銀染色でタンパク質を検出した。

2. 遠心法

Annexin Iを上記のようにEGF-受容体キナーゼと反応後、ただちに10,000 x gで5分間遠心分離して膜分画を沈降させ、沈降した膜結合分画と上澄みの非結合分画に分離した。SDS-PAGEサンプル調整用緩衝液を添加して反応を停止させ、上記のようにSDS-PAGE, CBB染色を行った後、オートラジオグラフィーを行った。600 nmの吸光度で染色像と感光したX線フィルムをデンシドメーターで測定し、基質タンパク質の膜への結合量やリン酸化量を定量した[13]。

第 三 節 結 果

C キナーゼの自己リン酸化に対するイオン強度と Ca^{2+} の効果

C キナーゼの活性化には Ca^{2+} を要求されるが、DGやTPA存在下にはその Ca^{2+} 要求性は極めて低くなる [1]。DGやTPAのような cofactor なしでは 10^{-4}M の Ca^{2+} が必要であるが、DG存在下では 10^{-7}M 程度に要求量が減少する。TPA存在下では 1 mM EGTA存在下でも一部のアイソザイムが活性化することが知られている [17]。同様なことは C キナーゼの自己リン酸化でも見られる。すなわち図 I-1 に示すごとく、DGを cofactor として用いた場合、EGTA存在下では自己リン酸化は見られず、 Ca^{2+} の濃度に依存して C キナーゼの自己リン酸化の増加がみられた (図 I-1A)。一方 TPAを cofactor とした場合、 1 mM EGTA存在下でもかなり強い自己リン酸化が観察された (図 I-1B)。またこの自己リン酸化は、少なくとも 200 mM NaCl 添加による比較的低いイオン強度の上昇によっては、ほとんど影響されなかった (図 I-1C)。

C キナーゼの基質タンパク質のリン酸化活性と C キナーゼの自己リン酸化の関係については必ずしも明らかではないが、自己リン酸化が C キナーゼの活性化に伴って起こることから、C キナーゼの酵素としての活性化の指標となるものと考えられている [18]。このように TPA による C キナーゼの自己リン酸化に対して、 Ca^{2+} や 200 mM NaCl 程度のイオン強度の増大は大きな影響を与えないことから、C キナーゼの活性化そのものに対しても影響は少ないことが示唆された。

Histone type IIIS の C キナーゼによるリン酸化の膜結合依存性

図 I-2A は、Histone type IIIS の C キナーゼによるリン酸化

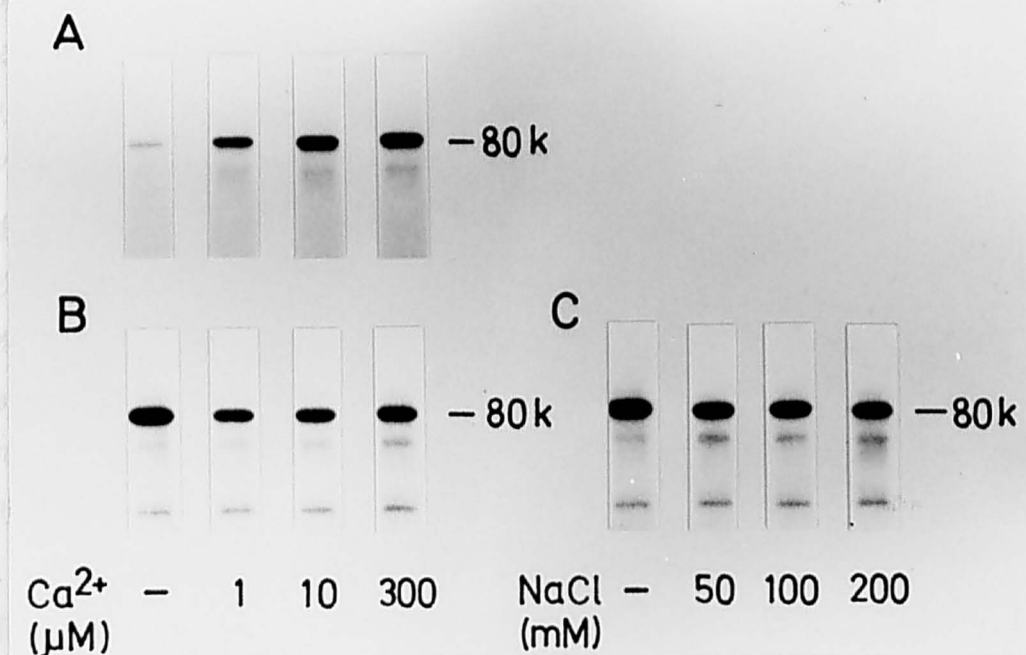


Fig.I-1.Effect of Ca^{2+} or ion strength on autophosphorylation of protein kinase C. Rat brain protein kinase C was autophosphorylated in the presence of 1 mM phospholipid (DPPC/PS=4/1) without substrate proteins. Autophosphorylation was indicated as figures of autoradiograph. A, effect of Ca^{2+} in the presence of 50 μM DO; B, effect of Ca^{2+} in the presence of 100 nM TPA; C, effect of NaCl in the presence of 0.3 mM Ca^{2+} and 100 nM TPA; Ca^{2+} -, 1 mM EGTA; 80 k, the position of protein kinase C.

Annexin I および C...-kinase の C キナーゼ によるリン酸化とその阻害作用

Annexin I は、C キナーゼ を阻害して Ca^{2+} -依存性リン酸化を抑制する

とリン脂質膜への結合性を示している。Histone type IIISのリン酸化量は Ca^{2+} の濃度に依存してやや増加した。一方膜結合に関しては、Histone type IIISはDPPCのみで作製したリン脂質膜には結合せず、PS含有リン脂質膜とは結合した。この結果は可溶性タンパク質であるHistone type IIISも、PSに依存してリン脂質膜と結合することを示している。またこのHistone type IIISのPS含有リン脂質膜への結合は、 Ca^{2+} 添加によってほとんど影響を受けなかった。おそらく Ca^{2+} 濃度の上昇によるリン酸化の増大は、Histone type IIISとリン脂質膜との相互作用が関与するものではなく、Cキナーゼそのものの活性化の進行によるものであろう。

次に、Histone type IIISとリン脂質膜との相互作用の重要性を明らかにするために、Cキナーゼ活性化の至適条件下でのHistone type IIISのリン酸化に対するイオン強度の影響について解析した。図I-2Bはその結果を示す。まずCキナーゼによるリン酸化については、至適リン酸化条件下にNaClを添加すると、添加したNaClの濃度に依存してHistone type IIISのリン酸化は強く阻害された。その時のHistone type IIISのPSに依存したリン脂質膜への結合は、NaCl添加により濃度依存的に阻害され、両者の関係はよく平行していた。前述のように、Cキナーゼの自己リン酸化はこのNaCl濃度では阻害されないことから、Histone type IIISのPS含有リン脂質膜との相互作用がCキナーゼによるリン酸化に必要であることが強く示唆された。

Annexin I および Cathepsin-Lisozyme の C キナーゼ による リン 酸化 と その 膜 結 合 性

Annexin Iは、Cキナーゼと同様に Ca^{2+} -酸性リン脂質依存性

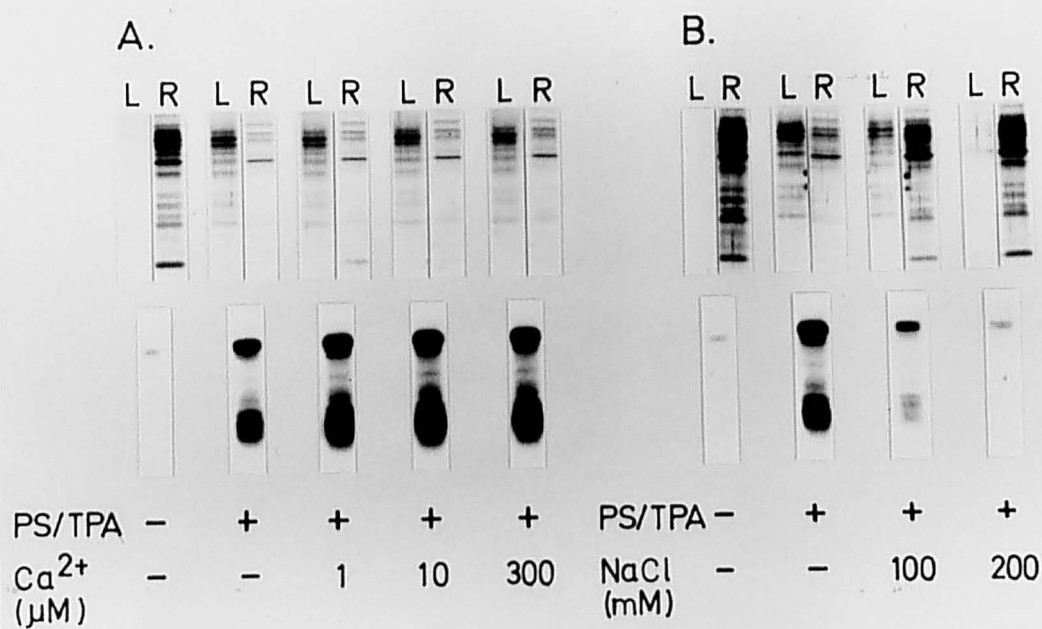


Fig.I-2.Effect of Ca^{2+} or ion strength on the interaction of histone type IIIS with phospholipid vesicles and on the phosphorylation by protein kinase C. Association of histone type IIIS with phospholipid vesicles (upper panels), and phosphorylation by protein kinase C (lower panels) were measured in various concentration of Ca^{2+} (A) or NaCl (B). Concentrations of histone type IIIS used was 50 $\mu\text{g/ml}$. The association was measured in the absence of ATP and protein kinase C. The effects of NaCl were measured in the presence of 0.3 mM Ca^{2+} . The phosphorylation or the association was indicated as figures of autoradiograph or silver staining, respectively. Ca^{2+} -, 1 mM EGTA; PS/TPA-, 1 mM DPPC; PS/TPA+, 1 mM DPPC /PS = 4/1 + 100 nM TPA; L, phospholipid associated fraction; R, unassociated fraction.

膜結合タンパク質で、Cキナーゼの良い基質となる細胞質タンパク質のひとつである。細胞膜やリン脂質膜への結合に Ca^{2+} を要求することから、膜結合性とCキナーゼによるリン酸化との関係を解析するのに適している[8,9]。一方 $\text{C}_{14:0}$ -lysozymeは、LysozymeをN-hydroxysuccinimidのミリスチン酸エステルを用いてミリスチン酸化したタンパク質である。リン脂質膜との相互作用が弱いLysozymeは、Cキナーゼによってはほとんどリン酸化を受けないが、ミリスチン酸のような長鎖の脂肪酸で人工的に修飾を受けると、脂肪酸の持つ疎水性のために膜結合性を獲得すると同時にCキナーゼによってリン酸化されることが報告されている[11,15]。そしてそのリン脂質膜への結合は、疎水性に依存するため、 Ca^{2+} もPSも必要としない。そこでこの二つのタンパク質とCキナーゼを用いて基質タンパク質の膜結合性とリン酸化反応との相関性の解析を行った。

Annexin I は、図 I-3Aに示すように Ca^{2+} 濃度に依存してリン酸化され、EGTA存在下ではまったくリン酸化されなかった。リン脂質膜への結合は、EGTA存在下ではPSを含むリン脂質膜と結合せず、 Ca^{2+} 添加によりその濃度に依存してPS含有リン脂質膜に結合した。そして Ca^{2+} 濃度の増大による膜結合性の上昇に伴って、Cキナーゼによるリン酸化も促進された。しかしながら両者には若干の感受性の違いがあった。すなわち $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} 存在下では、Annexin Iは50%程度のリン脂質膜への結合が見られるのにもかかわらず、そのリン酸化は僅かであった。イオン強度に対しては、図 I-3Bに示すように、50-200 mM NaCl添加によるイオン強度の上昇により、Annexin I全体のリン酸化が低下し、その度合はAnnexin Iのリン脂質膜への結合の低下とよく相関していた。この結果はHistone type IIISの結果とよく類似していた。以上の結果から、Annexin IもCキナーゼによ

ってリン酸化されるには、リン脂質膜へ結合する必要があることが示唆された。

一方C...-kinaseの場合、Histone type IIIの場合と同様に Ca^{2+} 非依存的にリン酸化を受け、 Ca^{2+} 非依存的な膜結合の様式とよく一致した(図1-4A)。その膜結合性は、DPPCのみのリン脂質膜に多く結合し、PSを含むリン脂質膜に対しては結合量が減少した。

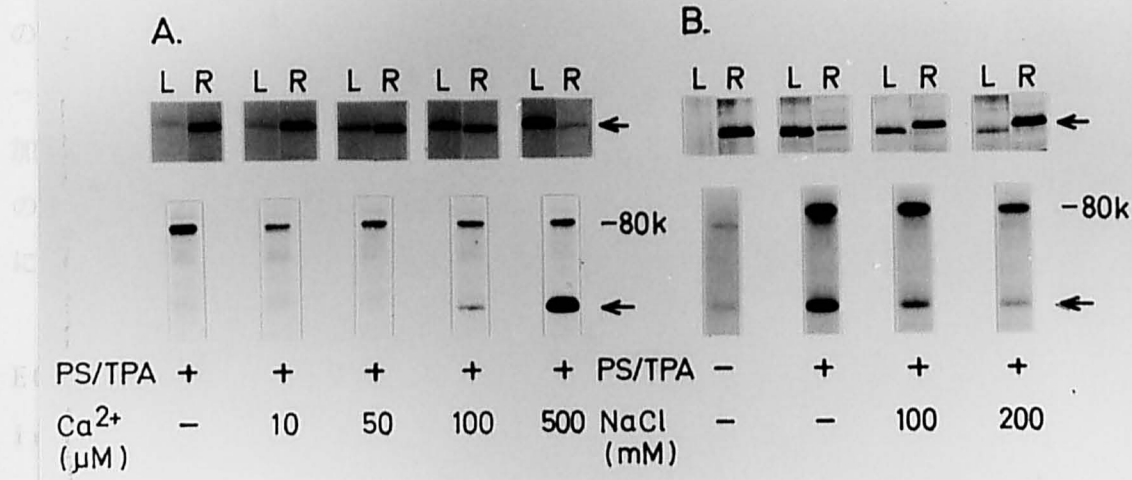


Fig.1-3.Effect of Ca^{2+} or ion strength on the interaction of annexin I with phospholipid vesicles and on the phosphorylation by protein kinase C. Association of annexin I with phospholipid vesicles (upper panels), and phosphorylation by protein kinase C (lower panels) were measured in various concentration of Ca^{2+} (A) or NaCl(B). Concentration of annexin I used was 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The association was measured in the absence of ATP and protein kinase C. The effects of NaCl were measured in the presence of 0.3 mM Ca^{2+} . The phosphorylation or the association was indicated as figures of autoradiograph or silver staining, respectively. Arrows indicate the position of annexin I. Ca^{2+} -, 1 mM EGTA; PS/TPA-, 1 mM DPPC; PS/TPA+, 1 mM DPPC/PS = 4/1 + 100 nM TPA; 80 k, the position of protein kinase C; L, phospholipid associated fraction; R, unassociated fraction.

以下の Ca^{2+} 濃度では、EGF受容体キナーゼによってほとんどリン酸化されないが、それ以上の濃度で急速にリン酸化が起こり、100 μM 以上の濃度では反って減少した。図1-4はAnnexin IのEGF受容体キナーゼによるリン酸化とそのリン酸化タンパク質の分布を示している。50 μM Ca^{2+} 存在下では、EGF受容体キナーゼによるリン酸化が最大となった。しかしながらAnnexin

ってリン酸化されるには、リン脂質膜へ結合する必要があることが示唆された。

一方 *Casein*-lysozyme の場合は、Histone type III の場合と同様に Ca^{2+} 非依存的にリン酸化を受け、 Ca^{2+} 非依存的な膜結合の様式とよく一致した (図 I-4A)。その膜結合性は、DPPC のみのリン脂質膜に多く結合し、PS を含むリン脂質膜に対しては結合量がかなり減少した。しかしながら、この PS を含むリン脂質膜への結合は、 Ca^{2+} やイオン強度によって大きな変化が見られなかった (図 I-4A, B)。またそのリン酸化も、 Ca^{2+} に依存して若干増加し、NaCl 添加によっては若干低下したのみであった。これらの結果も、基質タンパク質のリン脂質膜へ結合が、C キナーゼによるリン酸化に必要であることを強く示唆している。

EGF 受容体キナーゼによる Annexin I のリン酸化における Annexin I の膜結合依存性

EGF 受容体キナーゼは受容体型のタンパク質リン酸化酵素の一種で、基質タンパク質のチロシン残基をリン酸化する。Annexin I は EGF 受容体キナーゼの *in vivo* での基質タンパク質として知られている [19]。図 I-5 に Annexin I の Ca^{2+} 添加に伴う膜結合とそのリン酸化を示す。170 kDa の EGF-受容体キナーゼは、 Ca^{2+} の有無にかかわらず自己リン酸化していることから、 Ca^{2+} 非依存的に活性化していると推察された。Annexin I は 10 μM 以下の Ca^{2+} 濃度では EGF 受容体キナーゼによってほとんどリン酸化されないが、それ以上の濃度で急速にリン酸化が起こり、100 μM 以上の濃度では反って減少した。図 I-6 は Annexin I の EGF 受容体キナーゼによるリン酸化とそのリン酸化タンパク質の分布を示している。50 μM Ca^{2+} 存在下では、EGF 受容体キナーゼによるリン酸化が最大となった。しかしながら Annexin

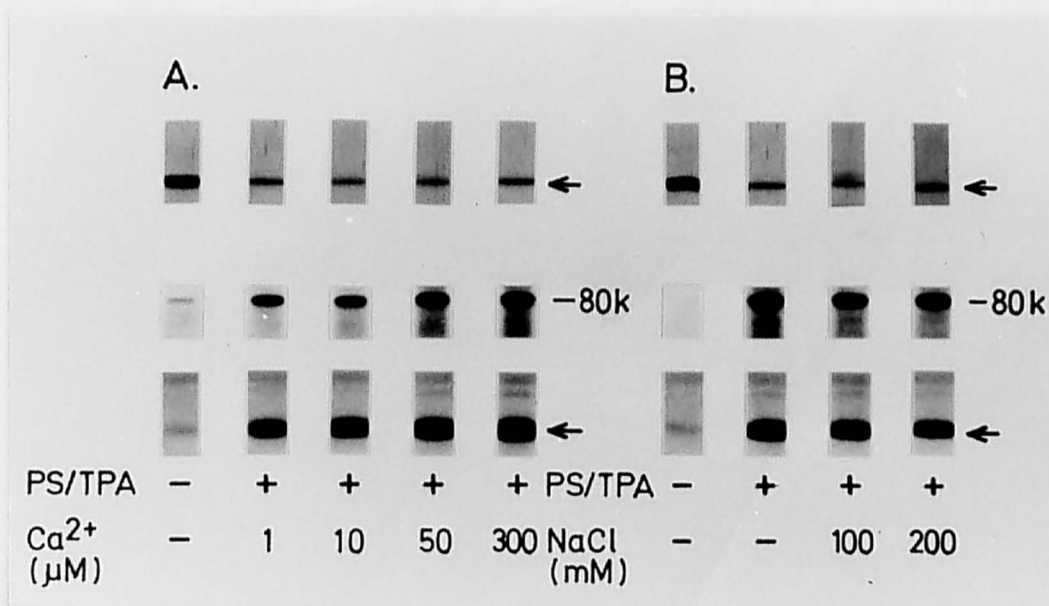


Fig.1-4. Effect of Ca^{2+} or ion strength on the interaction of $\text{C}_{14:0}$ -lisozyme with phospholipid vesicles and on the phosphorylation by protein kinase C. Association of $\text{C}_{14:0}$ -lisozyme with phospholipid vesicles (upper panels), and phosphorylation by protein kinase C (lower panels) were measured in various concentration of Ca^{2+} (A) or NaCl (B). Concentration of $\text{C}_{14:0}$ -lisozyme used was $50 \mu\text{g/ml}$. The association was measured in the absence of ATP and protein kinase C. The effects of NaCl were measured in the presence of $0.3 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$. The phosphorylation or the association was indicated as figures of autoradiograph or silver staining, respectively. Arrows indicate the position of $\text{C}_{14:0}$ -lisozyme. Ca^{2+} -, 1 mM EGTA; PS/TPA-, 1 mM DPPC; PS/TPA+, 1 mM DPPC/PS = 4/1 + 100 nM TPA; 80 k , the position of protein kinase C.

Iの膜への結合量は、増加してはいるが比較的少なく、大半が可溶性分画に存在し、そのタンパク化の大半も可溶性分画に観察された。Ca²⁺濃度をさらに上げると、遊結合のAnnexin Iはタンパク量として減少し、それに伴って遊結合のタンパク化タンパク質も減少し、500 μMで遊結合のAnnexin Iはなくなった。一方細胞膜結合Annexin Iの量は、50 μM以上でも濃度依存的

に見
Ca
リ
依
高

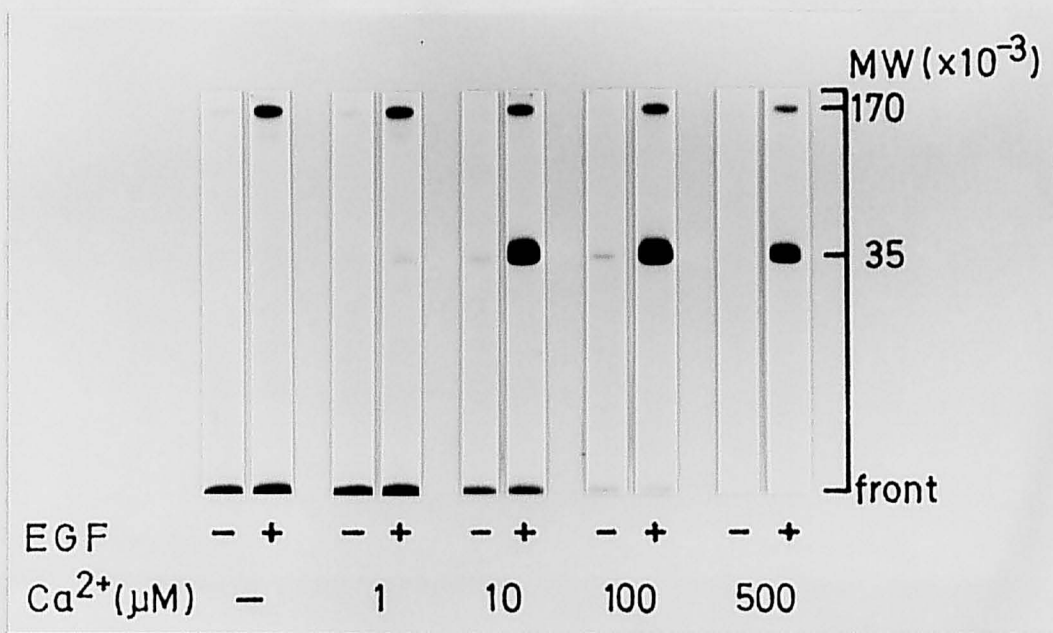


Fig.I-5.Effect of Ca²⁺ on the phosphorylation of annexin I by EGF-receptor kinase. Phosphorylation of annexin I by EGF-receptor kinase was measured in various concentration of Ca²⁺. Particulate fraction of A-431 cells was used as EGF-receptor kinase. Concentration of annexin I used was 200 μg/ml. The phosphorylation indicated as figures of autoradiograph. Ca²⁺-, 1 mM EGTA; EGF+, EGF-receptor kinase was activated by 0.2 μg/ml EGF; 170 kDa, the position of EGF-receptor kinase; 35 kDa, the position of annexin I.

Iの膜への結合量は、増加してはいるが比較的少なく、大半が可溶性分画に存在し、そのリン酸化の大半も可溶性分画に観察された。 Ca^{2+} 濃度をさらに上げると、非結合のAnnexin Iはタンパク量として減少し、それに伴って非結合のリン酸化タンパク質も減少し、500 μM では非結合のAnnexin Iはなくなった。一方細胞膜結合Annexin Iの量は、50 μM 以上でも濃度依存的に増加しているのにもかかわらず、リン酸化タンパクの増加は見られなかった。以上のように、膜結合量が比較的少ない低い Ca^{2+} 濃度では、 Ca^{2+} の上昇に伴ってEGF受容体キナーゼによるリン酸化とAnnexin Iの膜への結合量が共に上昇するが、濃度依存性に若干の相違が見られた。また結合量がかなり多くなる高い Ca^{2+} 濃度では、両者に相関は見られなかった。

第 四 節 考 察

通常細胞内の大部分のCキナーゼは細胞質に局在しているが細胞外の刺激応答に伴って増大した細胞内 Ca^{2+} や、新たに生成したDGに依存して細胞膜内面に結合し、活性化される。またDGやTPA存在下では Ca^{2+} の要求性が低下し、特にTPA存在下では不可逆的に膜に結合し、活性化する[20]。活性型Cキナーゼは細胞膜に局在しているため、その基質タンパク質をリン酸化する場所は、細胞膜内面および近傍に限定されると容易に想像される。Utsumiらは、可溶性タンパクであるLisozymeに化学修飾によって脂肪酸を結合させると、Cキナーゼの基質となることを見出した[11,15]。そのリン酸化は脂肪酸の鎖長に依存して増加し、DPPCのみからなるリン脂質への結合性の増加とよく相関することを報告している。これはCキナーゼが基質タンパク質と相互作用するためには、基質タンパク質が細胞膜と相互作用する必要があることを示唆している。本実験では、基質タンパク質の膜結合性とリン酸化の関係をさらに詳細に検討した。TPA存在下では、 Ca^{2+} 非存在下でもCキナーゼは強く自己リン酸化された。そして200 mM NaClまでのイオン強度の増大には大きな影響を受けなかった。Cキナーゼの自己リン酸化は、Cキナーゼとリン脂質との相互作用と酵素活性を反映していると考えられていることから[18]、この条件下では、Cキナーゼそのものの活性は大きな影響を受けないことが示唆された。そこで、この条件下での基質タンパク質のリン脂質膜への結合量とそのリン酸化量との関係を検討した。Histone type IIISは、PSに依存してリン脂質膜に結合し、その結合量は Ca^{2+} によってあまり大きな影響を受けなかった。そして Ca^{2+} 非存在下でも強くリン酸化を受け、膜結合性と同様に Ca^{2+} の濃度によって大

きな影響を受けなかった。Sekiguchiらは、TPA存在下ではCキナーゼのアイソザイムのうち、PKC β がCa²⁺非存在下でも強く活性化することを報告している[17]。おそらくこの活性化はPKC β の活性化によるものであろう。同様の結果は、PS非依存性膜結合タンパク質であるC_{14:0}-lysosomeでも観察された。なおC_{14:0}-lysosomeは、DPPCのみからなるリン脂質膜と比較してPSを含むリン脂質膜への結合がかなり減少した。これは相転移温度の低いBovine brain PSとの混合により、リン脂質膜の流動性が上昇したため、膜結合量が減少したものと想像される。一方Ca²⁺-酸性リン脂質依存性膜結合タンパク質であるAnnexin Iは、Ca²⁺非存在下では膜結合もリン酸化もしないが、Ca²⁺に依存して膜に結合し、リン酸化された。これらの結果もCキナーゼの基質タンパク質のリン酸化における基質タンパク質の膜結合の必要性を強く支持している。

イオン強度の変化に対しても、基質タンパクの膜結合量の変化とリン酸化には強い相関が見られた。Histone type IIISのPSに依存した膜結合は、イオン強度の上昇に対して感受性が高く、200 mM NaClでほとんど阻害された。そして膜結合量と同様にリン酸化も200 mM NaClで強く阻害された。Annexin Iの場合も同様に、イオン強度の上昇に伴って膜結合量もリン酸化量も減少し、両者には強い相関が見られた。一方C_{14:0}-lysosomeの膜結合性は、アシル鎖の疎水性によるので、200 mMまでのイオン強度の変化では大きな影響は見られなかったが、そのリン酸化はイオン強度の上昇に伴って若干減少した。この原因については明らかではない。HouseらはCキナーゼのカルボキシル末端の制御領域付近にリジン、アルギニンに富み、正荷電している偽基質構造が存在し、これが非活性化時の活性中心を隠していることを示唆した[21]。これは、基質タンパク質とCキナ

ーゼの活性中心との相互作用に静電的相互作用が関与していることを示唆しており、このためイオン強度の上昇によってCキナーゼとC_{14:0}-lysozymeの相互作用が直接阻害され、C_{14:0}-lysozymeのリン酸化が若干阻害されたのかもしれない。この点についてはさらなる検討が必要である。しかしながら、C_{14:0}-lysozymeの結果も、Cキナーゼによるリン酸化において基質タンパク質の膜結合が重要性であることを強く示唆している。このように Histone type IIIS, Annexin IおよびC_{14:0}-lysozymeのいずれの場合にも、Cキナーゼによるリン酸化において、基質タンパク質の膜結合の必要性が強く示唆された。

基質タンパク質の膜結合性とそのリン酸化の相関が、膜受容体型タンパク質リン酸化酵素の一つであるEGF受容体キナーゼによるAnnexin Iのリン酸化においても観察された。しかしながら、両者のCa²⁺に対する感受性に違いが見られた。膜結合量が比較的低い50 μMのCa²⁺濃度でリン酸化が最大となり、Ca²⁺添加によってさらに膜結合性が増大してもリン酸化は増大せず反って減少した。膜結合Annexin I量は100-500 μM Ca²⁺濃度で30%増加しているにもかかわらず、膜結合Annexin Iのリン酸化は100 μM以上のCa²⁺濃度では変化しなかった(図I-7B)。これはリン酸化されたAnnexin Iが膜結合したまま膜に止まるため、新たなAnnexin Iの膜への供給が阻害され、リン酸化が反って阻害されたのかもしれない。一方CキナーゼによるAnnexin Iのリン酸化にも感受性の違いが見られた。すなわち100 μM Ca²⁺存在下では、Annexin Iは50%程度のリン脂質膜への結合が見られたのにもかかわらず、そのリン酸化は僅かであった(図I-7A)。

このように、Annexin Iのリン酸化と膜結合性との関係は、Cキナーゼでは膜結合がやや先行するのに対し、EGF受容体キ

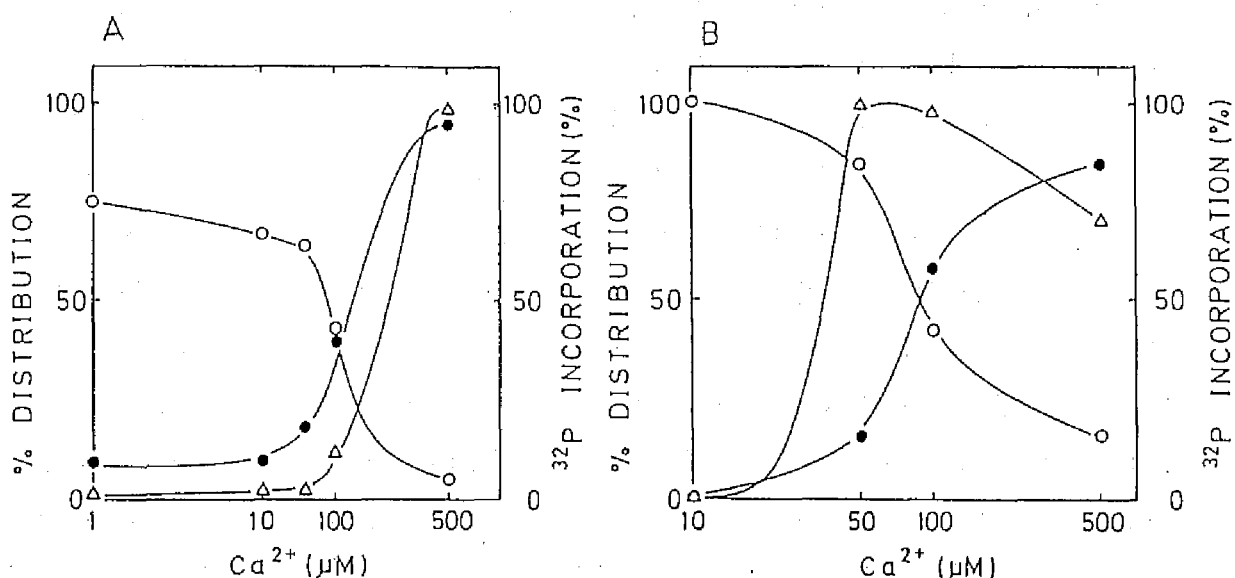


Fig.I-7. Correlation of membrane association of annexin I with its phosphorylation by protein kinase C or EGF-receptor kinase. A, Ca^{2+} -dependent association of annexin I with phospholipid vesicles, and Ca^{2+} -dependent phosphorylation by PKC were measured in the same condition as Fig.I-4. B, Ca^{2+} -dependent association of annexin I with particulate fraction of A-431, and Ca^{2+} -dependent phosphorylation by EGF-receptor kinase were measured in the same condition as Fig.I-6. Concentration of annexin I was detected by measuring density of silver stained (A) or CBB stained (B) gel at 600 nm. Rate of phosphorylation was detected by measuring density of autoradiograph at 600 nm. closed circle, membrane associated annexin I; open circle, unassociated annexin I; open triangle, total phosphorylation of annexin I.

ナーゼではリン酸化がやや先行した。これは、Annexine Iのリン酸化には膜結合性以外の要因が関係していることを示唆している。Hayashiらは、 Ca^{2+} 存在下のみにAnnexin Iと反応するモノクローナル抗体を用いて、その反応性と Ca^{2+} 濃度との関係を詳細に検討した[22]。モノクローナル抗体のAnnexine Iに対する反応は、 $10\ \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 濃度で見られるが、 $100\ \mu\text{M}$ までは比較的反応性は低く、 Ca^{2+} に依存した反応性の上昇が見られないのに対し、それより高い濃度で著しく高まることを報告している。これはAnnexine Iの Ca^{2+} による立体構造の変化が二段階あることを示唆している。またこの $10\text{--}100\ \mu\text{M}$ という Ca^{2+} 濃度は、EGF受容体キナーゼによるリン酸化が非常に高まる濃度に、 $100\ \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 濃度はCキナーゼによるリン酸化が高まる濃度に類似している。Annexine Iの両タンパク質リン酸化酵素によるリン酸化部位は、EGF受容体キナーゼがN末から21番目のチロシン残基、Cキナーゼが27,28番目のセリン残基であることが明らかにされている[23]。それぞれの立体構造に変化が起こる Ca^{2+} 濃度で、これらの残基のタンパク質内での位置的变化が起こり、それがリン酸化を受ける上で重要な役割を果たしているのかもしれない。

以上の結果を総合すると、CキナーゼやEGF受容体キナーゼ等の膜結合するタンパク質リン酸化酵素のリン酸化活性には、その基質タンパク質と細胞膜との相互作用が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

引用文献

1. Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature, 308:693-698, 1984.
2. Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., and Nishizuka, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. J. Biol. Chem. 252:7610-7616, 1977.
3. Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M., and Nishizuka, Y. Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. J. Biol. Chem. 258: 1156-1164, 1983.
4. Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T., and Nishizuka, Y. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (Calpain). J. Biol. Chem. 264:4088-4092, 1989.
5. Cross, F.R., Garber, E.A., Pellman, D., and Hanafusa, H. A short sequence in the p60^{src} N terminus is required for p60^{src} myristylation and membrane association and for cell transformation. Mol. Cell. Biol. 4:1834-1842, 1984.
6. Buss, J.E., Kamps, M.P., Gould, K., and Sefton, B.M. The absence of miristic acid decreases membrane binding of p60^{src} but does not affect tyrosine kinase activity. J. Virol. 58:468-474, 1986.
7. Linder, M.E., and Burr, J.G. Nonmyristoylated p60^{v-src} fails to phosphorylate proteins of 115-120 kDa in chicken embryo fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2608-2612, 1988.

8. Shlaepfer, D.D., and Haigler, H.T. Characterization of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. J. Biol. Chem. 262:6931-6937, 1987.
9. Sato, E.F., Tanaka, Y., Edashige, K., Kobuchi, H., Morishita, S., Sugino, Y.M., Inoue, M., and Utsumi, K. Expression of cDNA encoding lipocortin-like 39 kDa protein of guinea pig neutrophils in yeast. FEBS Lett. 255:231-236, 1989.
10. Bazzi, M.D., and Nelsestuen, G.L. Mechanism of protein kinase C inhibition by sphingosine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:203-207, 1987.
11. Utsumi, T., Yoshinaga, K., Koga, D., Ide, A., Nobori, K., Okimasu, E., Terada, S., and Utsumi, K. Association of myristated protein with a biological membrane and its increased phosphorylation by protein kinase C. FEBS Lett. 238:13-16, 1988.
12. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., and Nishizuka, Y. Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. J. Biol. Chem. 257:13341-13348, 1982.
13. De, B.K., Misano, K.S., Lukas, T.J., Mroczkowski, B., and Cohen, S. A calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. J. Biol. Chem. 261:13784-13792, 1986.
14. Boni, L.T., and Rando, R.R. The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols. J. Biol. Chem. 260:10819-10825, 1985.
15. Utsumi, T., Kofuji, H., Edashige, K., Utsumi, K., Koga, D., and Ide, A.

Correlation between membrane binding and phosphorylation by protein kinase C of acylated protein. Agri.Biol.Chem. 54:25-30, 1990.

16. Utsumi, K., Okimasu, E., Takehara, Y., Watanabe, S., Miyahara, M., and Moromizato, Y. Interaction of cytoplasmic proteins with liposomes and their cell specificity. FEBS Lett. 124:257-260, 1981.
17. Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ase, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. Mode of activation and kinetic properties of three distinct forms of protein kinase C from rat brain. J.Biochem. 103:759-765, 1988.
18. Newton, A.C., and Koshland, D.K. High cooperativity, specificity, and multiplicity in the protein kinase C-lipid interaction. J.Biol.Chem. 264:14909-14915, 1989.
19. Fava, R.A., and Cohen, S. Isolation of a calcium-dependent 35-kilodalton substrate for the epidermal growth factor receptor/kinase from A-431 cells. J.Biol.Chem. 259:2636-2645, 1984.
20. Bazzy, M.D., and Nelesstuen, G.L. Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase C. Biochem.Biophys.Res.Commun. 152:336-343, 1988.
21. House, C., and Kemp, B.E. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. Science, 238:1726-1728, 1987.
22. Hayashi, H., Owada, M.K., Sonobe, S., Domae, K., Yamanouchi, T., Kakunaga, T., Kitajima, Y., Yaoita, H. Monoclonal antibodies specific to a Ca^{2+} -dependent phospholipid-binding ability from its ability to inhibit phospholipase A_2 . Biochem.J. 269:709-715, 1990.

23. Varticovski, L., Chahwala, S.B., Whitman, M., Cantley, L., Schindler, D., Chow, E.P., Sinclair, L.K., and Pepinsky, R.B. Location of sites in human lipocortin I that are phosphorylated by protein tyrosine kinases and protein kinases A and C. Biochemistry, 27:3682-3690, 1988.

第二章 TPAによる細胞の分化および増殖に対するCキナーゼ阻害物質の効果とその機構

第一節 緒言

細胞の増殖や分化は、個体発生や組織の発達や維持に不可欠であり、その過程にはさまざまな細胞間のコミュニケーションが必要である。このコミュニケーションには、細胞外マトリックスや細胞膜のジャンクションのような細胞の接着によって伝達されるものの他に、ホルモンや増殖因子と呼ばれる可溶性因子によって伝達されるものがある。ある種のペプチドホルモンや細胞増殖因子が細胞膜受容体に作用すると、細胞膜のリン脂質代謝が亢進して IP_3 とDGが産生され、Cキナーゼが細胞膜に結合して活性化する。また皮膚二段階発癌において強力な発癌プロモーション作用を持つことがよく知られているTPAも、Cキナーゼと結合し、細胞膜に移行させ、これを活性化する。そのため、これらのホルモンや細胞増殖因子およびTPAの種々の細胞に対する様々な作用は、Cキナーゼを介して発現していると考えられている[1]。

TPA処理によりニワトリ胚性ミオブラスト、コンドロブラスト、メラノーマ、ニューロブラストーマおよび赤白血病細胞が終末分化することが知られている[2-5]。またHL-60等の多くの白血病細胞に対しても、増殖の停止とマクロファージへの分化を誘導する[6,7]。TPAは終末分化だけでなく、初期ないしは早期の胚の分化も誘導する。その例としてアフリカツメガエルの神経溝の誘導等が報告されている[8]。一方TPAは強力な発癌プロモーション作用を有し、マウス皮膚を過形成させたり、静止期のSwiss3T3細胞を細胞増殖期へ移行させる等細胞増殖に関

与することも知られている[9]。またPDGFおよびEGF等の細胞増殖因子は、一部の細胞に対してイノシトールリン脂質の代謝回転を亢進させることから、これらの増殖因子による細胞機能の発現には、Cキナーゼの活性化も関与していることが示唆されている[10,11]。またTPAによるマウス皮膚表皮過形成は、EGFと受容体を共有する腫瘍増殖因子(TGF- α)の合成誘導によって起こることが示唆されている[12]。これらの増殖因子によってイノシトールリン脂質の代謝回転の亢進が起こる機構については、チロシンリン酸化酵素活性を有するEGFやPDGFの受容体が、EGFやPDGFの結合によって活性化し、ホスホリパーゼC γ のチロシン残基をリン酸化してこれを活性化することによると考えられている[13]。またTPAはEGF受容体のmRNAを増加させたり、細胞膜上のEGF受容体を増加させることが知られており、これにはEGF受容体のCキナーゼによるリン酸化が関与すると考えられている[14,15]。またTPAによるEGF受容体のmRNAの増加は、Cキナーゼの阻害物質のひとつであるStaurosporineによって阻害される[16]。以上のように、Cキナーゼはある種の増殖因子の情報伝達にも深く関与しており、この作用も細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。

ここで生殖器官等の組織の発達におけるCキナーゼの関与する可能性のある増殖因子の作用を考えてみると、たとえば妊娠による乳腺の発育は、プロゲステロンやエストロゲンが関与しているが、EGFが乳腺細胞を濃度依存的に増殖させることや、EGFの主な産生部位である顎下腺を除去したラットを妊娠させると乳腺の発育が不十分になることから、EGFが乳腺の発育に重要な役割を果たしていることが示唆されている[17]。また卵巣の卵胞の発育は通常下垂体からの性腺刺激ホルモンに制御されているが、未熟な卵胞の発育は性腺刺激ホルモン依存性が低い。

EGFが種々の動物の顆粒膜細胞を増殖させることから、未熟な卵胞の発育にEGFが関与していることが示唆されている[18]。一方PDGFは、胎盤に存在し、胎盤トロホブラストに作用して胎盤の成長に関与していると考えられている[19]。このような増殖因子による細胞増殖作用に対して、Cキナーゼは直接あるいは間接的に関与しているものと考えられる。

以上のようにCキナーゼの活性化が個体発生や細胞の分化や増殖における情報伝達に深く関与していることが強く示唆されているが、Cキナーゼの活性化を介する情報が、その後どのような経路で細胞機能発現に繋がるかについては、まだその多くは不明である。そこで、分化や増殖に関与するCキナーゼを介した情報伝達について、第一章の結果をもとに細胞質タンパク質と細胞膜との相互作用という観点から解析を試みた。細胞の分化および増殖のモデルとして、それぞれTPAによるHL-60細胞のマクロファージへの終末分化およびTPAによる皮膚発癌プロモーションを用いて、その阻害物質の細胞質タンパク質と細胞膜との相互作用に対する効果を解析した。

第 二 節 TPAによる前骨髄性白血病細胞HL-60の分化に対するCキナーゼ阻害物質の効果とその機構

哺乳動物の発生・分化の研究は、遺伝子操作技術の発達によって個体レベルでの研究が急激に進展しているが、従来のin vitroでの培養細胞を用いた分化の研究も今なお非常に重要である。培養細胞における分化の研究において、前骨髄性白血病細胞HL-60は胚性癌腫細胞F9や赤白血病細胞MELと並んで最もよく研究されている細胞である。HL-60はさまざまな分化誘導剤によって分化するが、いずれの誘導剤も細胞内の受容体を介した情報伝達と密接に結びついている。HL-60は分化誘導によって顆粒球、マクロファージ、好酸球、好塩基球に分化する[20]。HL-60はTPA, Vitamin D₃等によってマクロファージに分化する[21,22]。これらの物質によるマクロファージへの分化は、ある種のCキナーゼ阻害剤で阻害される[23-26]。またこれらの分化誘導物質に対する耐性株では、Cキナーゼに量的変化がみられることから[27,28,30]、マクロファージへの分化には、Cキナーゼの活性化が重要な役割を果していると考えられている。そこで本節では、TPAによるマクロファージへの分化と各種Cキナーゼ阻害剤の作用機構から、分化における細胞膜と細胞質タンパク質の相互作用の重要性を検討した。

1. 材料と方法

試薬

H-7とCキナーゼのアイソザイムに対するモノクローナル抗体(抗PKC α , PKC β , PKC γ 抗体)は生化学工業より購入した。SphingosineおよびTrifloroperazine(以下TFPと呼ぶ)はそれぞれ

れフナコシ薬品およびSigma社のものを使用した。エステラーゼ活性測定キットは武藤化学薬品のものを使用した。

HL-60の培養

HL-60は、プラスチック製フラスコを用いて、10% FCS添加 RPMI-1640中で37°C、5%CO₂+95%空気下で培養した。各実験では直径5cmのプラスチック製培養皿に 2×10^5 cells/mlの濃度に調整した。Ethanolに溶解した各種薬剤を添加し、1時間後に10 nM TPAないしはその溶媒量に相当するEthanolを添加し、16、24、36、48時間後に結果を判定した。

培養皿への細胞の付着

TPA添加後24時間目の浮遊細胞数と付着細胞数から細胞200ヶあたりの付着細胞数の割合を算出した。

非特異性エステラーゼの誘導

TPA添加後48時間目に細胞を回収し、洗滌せずにスライドグラス上に塗抹乾燥後、 α -naphthyl butyrateを基質とするエステラーゼ活性測定キットで染色し、顕微鏡下で細胞200ヶあたりのエステラーゼ陽性細胞の割合を算出した。

Annexin I の誘導

TPA添加後36時間目に細胞を回収(1×10^6 cells)し、Krebs-Ringerリン酸緩衝液で2回洗滌し、氷冷した2 mM EGTA、2 mM PMSF、0.1% Leupeptin、0.1% SDS、1% Deoxycholic acid、1% Triton X-100、150 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl(pH 8.0)緩衝液に懸濁して細胞を破壊した。30分氷中に静置し、20,000 x gで30分遠心し、その上澄みをサンプルとした。Annexin I量

はImmunoblotで検出した。すなわち、サンプルをLaemmli法に従ってSDS-PAGEを行い、常法にしたがってPVDF膜に転写した。一次抗体は抗組換えAnnexin Iウサギ抗体、二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGロバ抗体を用い、Amersham社のECL detection systemによって、抗体結合量を化学発光によるX線フィルムの感光で検出し、Annexin I量とした。

Cキナーゼの精製

CキナーゼはKikkawaらの方法に従って精製した[31]。すなわち、ラット脳を0.25 M ショ糖、10 mM EGTA、2 mM EDTA、1 mM PMSFを含む20 mM Tris-HCl (pH.7.5)緩衝液中でポッターエルベジューム型ホモジナイザーでホモジナイズし、100,000 \times gで60分間遠心して上澄みを回収し、そのまま0.5 mM EGTA、0.5 mM EDTA、10 mM β -mercaptoethanolを含む20 mM Tris-HCl (pH.7.5)緩衝液 (buffer A)で平衡化したDE-52カラム (3 \times 17 cm)にかけ、20 mM NaClを含むbuffer Aで洗滌後、90 mM NaClを含むbuffer Aで溶出してきたCキナーゼ活性分画を回収した。そしてそのままbuffer Aで平衡化したThreonine-Sepharoseカラムにかけ、0.4M NaClを含むbuffer Aで洗滌後、1 M NaClまでのlinear-gradientにより、溶出した活性分画を集めた。活性分画をそのまま1 M NaClを含むbuffer Aで平衡化したTSKG Phenyl-5PWカラムにかけ、1 M NaClを含むbuffer Aで洗滌後、0 M NaClまでのlinear-gradientにより、活性分画を回収した。これを限外濾過膜で1/4-1/5に濃縮し、0.1 M NaClを含むbuffer Aで平衡化したTSKG-3000SWでゲル濾過して活性分画を精製Cキナーゼとした。

C キナーゼ量の測定

TPA添加後16時間目に細胞を回収し(7×10^5 cells)、Annexin Iと同様にImmunoblotを行い、化学発光によるX線フィルムの感光で検出した。一次抗体は、市販のウサギ脳Cキナーゼの代表的なアイソザイムに特異的な単クローン抗体を用い、二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGウサギ抗体を使用した[27]。

C キナーゼのリン脂質膜への結合

Cキナーゼのリン脂質膜への結合は、第一章第二節をもとにflotation法を行って測定した。すなわち、1 mM EGTAないしは0.3 mM Ca^{2+} 、10 mM Mg acetateを含む20 mM Tris-HCl(pH 7.5)緩衝液中で100 μ M リン脂質膜(DPPCのみ、ないしはDPPC/PS=4/1 + 100 nM TPA)とラット脳精製Cキナーゼを30°Cで10分反応させ、Ficoll不連続密度勾配遠心法でリン脂質膜結合分画と非結合分画に分け、抗PKC β 単クローン抗体を用いてImmunoblotを行い、膜結合Cキナーゼ量を測定した。

2. 結果

HL-60はTPAによって前骨髄芽球からマクロファージに分化し、それに伴ってマクロファージに特徴的な性質が発現してくる。本実験では培養皿への接着、非特異性エステラーゼの誘導およびAnnexin Iの誘導について検討した。

H-7、Sphingosine、TFPはいずれもCキナーゼの阻害物質であると同時に、すでにHL-60のTPAによるマクロファージへの分化を阻害する作用があることが報告されている[23-25]。培養皿への接着は、TPA処理した細胞では24時間後で92%接着したの

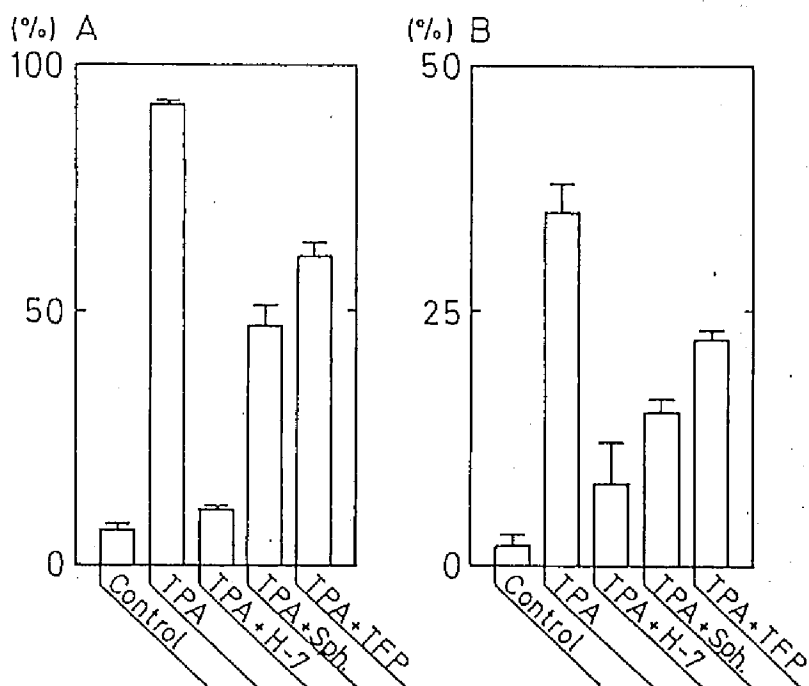


Fig.II-1. Phenotypic differentiation of HL-60 induced by TPA. HL-60 (2×10^6 cells/ml) were pretreated with or without drugs for 1 hr and then treated with 10 nM TPA for 24 hr(A) or 48 hr(B). (A) the percentage of adherent cells, (B) the percentage of nonspecific esterase positive cells: H-7, 30 μ M H-7; Sph., 7 μ M sphingosine; TFP, 7 μ M trifluoroperazine. Data indicate means of triplicate determinants + SEM. All values of pretreated cells with protein kinase C inhibitors were significantly different from that of non-pretreated cells, $p < 0.05$ (Student's t-test)

に対し、H-7 30 μ M 前処理細胞で11%、Sphingosine 7 μ Mで47%、TFP 7 μ Mで65%に止まった。非特異性エステラーゼ活性も、48時間後でTPA処理細胞では37%の細胞で誘導が見られたのに対し、H-7 30 μ M 前処理では8%、Sphingosine 7 μ Mでは14%、TFP 7 μ Mでは22%に止まった。これらの結果は、これらの物質がHL-60のTPAによる分化を抑制するとの既報の結果と一致している。一方TPAによるマクロファージへの分化に伴って誘導されるAnnexin I量は[32]、TPA添加によって著しく増加したが、これらのCキナーゼ阻害物質の添加によってほとんど阻害されなかった(図 II-2)。この結果は、これらの阻害剤がマクロファージへの分化に伴って発現する性質を完全には阻害していないことを示唆している。

TPAによるマクロファージへの分化の機構については必ずしも明らかではないが、TPAの細胞内標的がCキナーゼであることから、Cキナーゼの活性化が関与していることが示唆されている。TPA添加によりHL-60の17 kおよび27 kDaタンパク質のリン酸化が起こることが報告されており、このリン酸化が分化に関与していることが示唆されている[23]。上記のCキナーゼ阻害物質のうちH-7とTFPは、TPA添加に伴う17 kおよび27 kDaの細胞内タンパクのリン酸化を抑制することがすでに報告されている[23,25]。一方TPAによるHL-60の分化には、TPA添加によるCキナーゼの細胞膜への移行とその後のダウンレギュレーションが関与することも示唆されている[27,29,30,33-35]。そこでHL-60のTPAによる分化におけるCキナーゼの各アイソザイムの量的変化と、それにおよぼす上記の分化阻害剤の効果を検討した。図II-3にその結果を示す。PKC α は、TPA添加により若干の増加が観察された。またHL-60ではほとんど存在しないPKC γ がTPAにより微量ながら検出された。一方HL-60では最も大量に

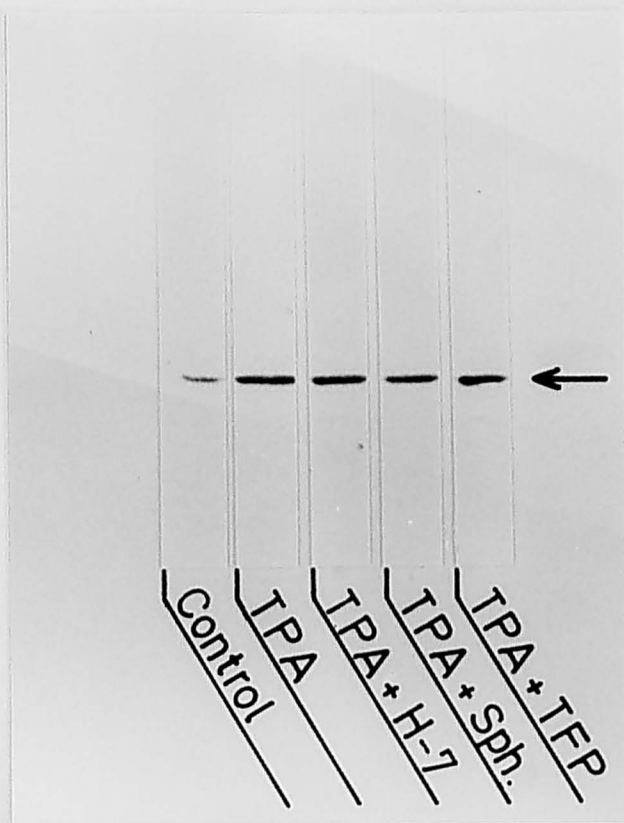
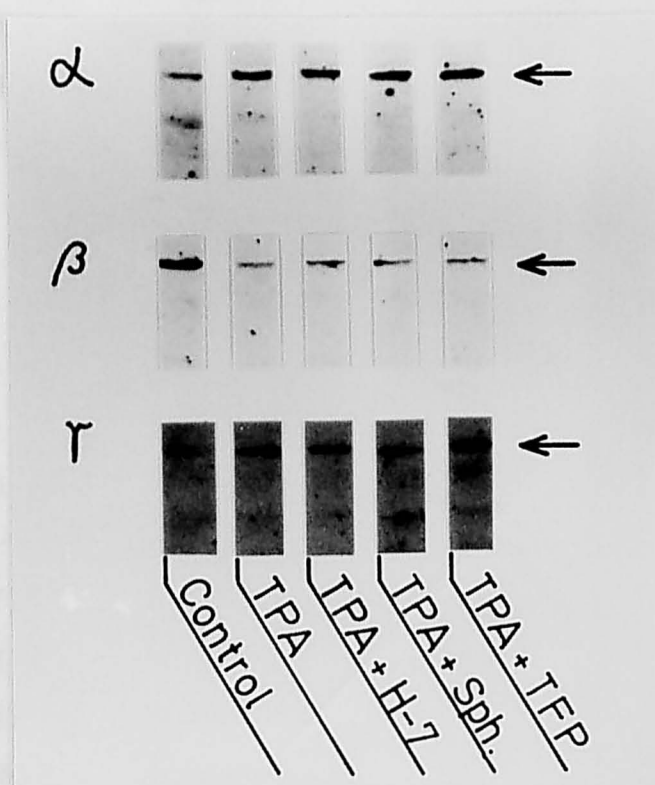


Fig.II-2. Induction of annexin I in HL-60 differentiated by TPA. HL-60 were pretreated with protein kinase C inhibitors and then treated with TPA in the same condition as Fig.II-1. After treated with TPA for 36 hr, 1×10^6 cells were lysed and immunoblotted as described in "materials and methods".

含まれている。PKC β はTPA処理により著しく減り、グラウンデ
デュレーションされていた。そしてCキナーゼ関連物質は、い
ずれのCキナーゼのアイソザイムの量的変化にもほとんど影響が
なかった。

Cキナーゼの
に依存して細胞
質分解酵素が
ると考えられて
ナーゼよりも
優先的に分解す
Cキナーゼを
ウンレデュレー
ら、これらの
PKC β の細胞膜
で、Cキナーゼ
別の効果を示す

図II-4にその
Sphingosine



では、Cキ
タンパク
質をしてい
るためCキ
ナーゼを
花している
PAによるダ
ったことが
示すが、
ある、そこ
ナーゼ関連

1995年、
の薬理は

Fig.II-3.Immunoblot analysis of protein kinase C isozymes in HL-60 dif-
ferentiated by TPA. HL-60 cells were pretreated with the drugs and then
treated with TPA in the same condition as Fig.II-1. After treated with
TPA for 16 hr, 7×10^6 cells were lysed and immunoblotted as described
in "materials and methods". α , PKC α ; β , PKC β ; γ , PKC γ .

に依存してリン脂質膜に移行した。そして、いずれの阻害剤も
PKC β のリン脂質膜への結合を阻害しなかった。この結果は、
これらの阻害物質はTPAによるHL-60中のCキナーゼの活性化を
阻害することによって17 kDaおよび27 kDaタンパク質のリン酸化
を阻害するが、細胞膜への移行は阻害しないため、Cキナーゼ
(特にPKC β)のグラウンデュレーションを阻害しないことを示
唆している。

含まれている PKC β は TPA 添加により著しく減少し、ダウンレギュレーションされていた。そして C キナーゼ阻害物質は、いずれの C キナーゼのアイソザイムの量的変化にほとんど効果がなかった。

C キナーゼのダウンレギュレーションの機構としては、Ca²⁺ に依存して細胞膜に結合して活性化する、Ca²⁺ 依存性タンパク質分解酵素カルパインによって分解を受けることが関与していると考えられている [36, 37]。カルパインは膜非結合型の C キナーゼよりも、TPA や DG によって膜結合している C キナーゼを優先的に分解することから、細胞膜に移行して活性化している C キナーゼを分解すると考えられている。PKC β の TPA によるダウンレギュレーションに分化阻害物質の効果がなかったことから、これらの物質は C キナーゼのリン酸化活性を阻害するが、PKC β の細胞膜への移行を阻害していない可能性がある。そこで、C キナーゼのリン脂質膜への結合に対する C キナーゼ阻害剤の効果を検討した。

図 II-4 にその結果を示す。各阻害剤の濃度は H-7 は 100 μ M、Sphingosine は 50 μ M、TFP は 100 μ M とした。これらの濃度は、C キナーゼの Histone type IIIS のリン酸化活性に対する、それぞれ 82%、98%、70% 阻害濃度にあたる (データは示さない)。PKC β は EGTA 存在下に DPPC 膜には結合せず、Ca²⁺、PS および TPA に依存してリン脂質膜に移行した。そして、いずれの阻害剤も PKC β のリン脂質膜への結合を阻害しなかった。この結果は、これらの阻害物質は TPA による HL-60 中の C キナーゼの活性化を阻害することによって 17 k および 27 kDa タンパク質のリン酸化を阻害するが、細胞膜への移行は阻害しないため、C キナーゼ (特に PKC β) のダウンレギュレーションを阻害しないことを示唆している。

7. 考 察

TPA、Phorbol 12-myristate 13-acetate による PKC α の活性化が、いずれも C キナーゼの阻害剤で効果が阻害されたり、細胞内 C キナーゼ量が変化することから、C キナーゼを介した増殖促進が強く関与していると考えられる [11-13]。また、TPA、12-O-14

マクロ

かの C

への分

増殖

られた

は、こ

べて阻

TPAに

ないが

質のリ

ダウン

[23, 27]

いては

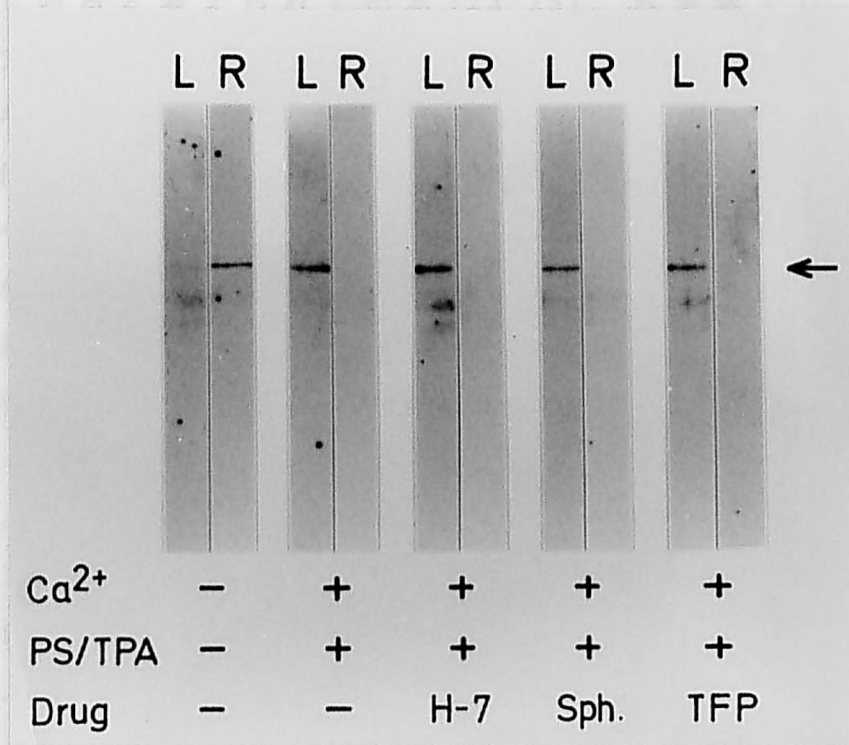


Fig.II-4. Immunoblot of phospholipid binding protein kinase C- β . Protein kinase C purified from rat brain was incubated with 0.3 mM Ca²⁺, 100 μ M phospholipid with or without protein kinase C inhibitors for 10 min. Phospholipid associated protein kinase C was separated by flotation method followed by immunoblotted with anti-PKC β monoclonal antibodies as described in "materials and Methods". Ca²⁺-, 1 mM EGTA; PS/TPA-, 100 μ M DPPC; PS/TPA+, 100 μ M DPPC/PS = 4/1 + 100 nM TPA; L, membrane associated fraction; R, unassociated fraction; H-7, 100 μ M H-7; Sph., 50 μ M sphingosine; TFP, 100 μ M trifluoroperazine.

増加し、10-100中に増加した。PKC α が減少しながら増加した。C キナーゼの阻害剤で効果が阻害されたり、細胞内 C キナーゼ量が変化することから、C キナーゼを介した増殖促進が強く関与していると考えられる [11-13]。また、TPA、12-O-14 マクロ

3. 考察

TPA、Vitamine D₃によるマクロファージへの分化は、いずれもCキナーゼの阻害剤で分化が阻害されたり、細胞内Cキナーゼ量に変化することから、Cキナーゼを介した情報伝達が深く関与していると考えられている[23-25]。本実験では、HL-60のマクロファージへの分化を阻害することが知られているいくつかのCキナーゼ阻害物質を用いて、いくつかのマクロファージへの分化の指標に対するその阻害効果を検討した。その結果、培養皿への接着、非特異性エステラーゼの発現等には阻害が見られたが、Annexin Iの誘導には阻害が見られなかった。これは、これらの物質が必ずしも分化に伴って起こる細胞機能をすべて阻害している訳ではないことを示している。

TPAによるHL-60の分化の機構については必ずしも明らかではないが、Cキナーゼの活性化による17 kおよび27 kDaタンパク質のリン酸化と、Cキナーゼの活性化に伴う細胞膜への移行とダウンレギュレーションが重要であることが示唆されている[23, 27, 29, 31, 33-35]。これらの阻害物質のうちH-7とTFPについては、すでに17 kおよび27 kDaタンパク質のリン酸化を阻害することが報告されているので[23, 25]、本研究ではCキナーゼの膜への移行とダウンレギュレーションに注目した。TPA添加後16時間で、最もHL-60に多く存在するPKC β はかなり減少し、ダウンレギュレーションされていた。またPKC α は反対にやや増加し、HL-60中にほとんど存在しないPKC γ が僅かながら検出された。Cキナーゼのアイソザイムのうち、TPA存在下ではPKC β がCa²⁺非依存的に活性化し、三つのアイソザイムのうち最もTPAに対する感受性が高いことから、NishikawaらはPKC β が分化に重要な役割を果たしていると考えしている[27]。驚いたことに、Cキナーゼ阻害作用を持つ分化阻害物質は、いずれのC

キナーゼのアイソザイムの量的変化に対しほとんど効果を示さなかった。もしPKC β のダウンレギュレーションやその他のCキナーゼの量的変化が、HL-60のマクロファージへの分化に重要な役割を果たしているとするなら、今回用いた分化阻害剤の作用は、分化を完全に阻害するには充分ではないことになる。

CキナーゼのTPAによるダウンレギュレーションは、カルパインによるCキナーゼの分解が関与すると考えられている[36, 37]。タンパク質分解酵素であるカルパインは、Cキナーゼと同様にCa²⁺に依存して細胞膜に移行して活性化する。Cキナーゼは、リン脂質膜に結合することによってカルパインに分解されやすくなることから、ダウンレギュレーションにはCキナーゼが活性化されて細胞膜に結合している必要があると推察されている。CキナーゼのTPAによる膜への結合に対して、上記阻害物質はCキナーゼのHistone type IIISのリン酸化を強力に阻害する濃度でも結合を阻害しなかった。以上の結果は、これらの薬物はCキナーゼの活性化そのものは阻害するため、17 kおよび27 kDaタンパク質等の分化に関与するタンパク質のリン酸化を阻害するが、PKC β の細胞膜への移行を阻害しないことから、分化に関与すると考えられているPKC β のダウンレギュレーションを阻害しないことを示唆している。そのため、これらの阻害物質が必ずしも全ての分化の指標を阻害しないのかもしれない。

細胞が分化したか否かは、形態的、生化学的あるいは分子生物学的指標をもとに判定される。しかし薬物の細胞分化に対する効果を判定する場合、各指標に対する効果が分化そのものに対する効果なのか、あるいは分化に伴って発現する現象に対する二次的な効果なのかの判定は容易ではない。分化阻害物質によって阻害されなかったAnnexin Iの誘導が、分化に直接関与

しているものか否かについてはさらなる検討が必要である。

以上のように、TPAによるHL-60の分化には、細胞質タンパク質であるCキナーゼやカルパインが細胞膜と結合することが重要であることが示唆された。

第 三 節 TPAによる細胞増殖とCキナーゼの基質タンパク質と細胞膜との相互作用

Cキナーゼの活性化物質であるTPAは、皮膚二段階発癌やいくつかの培養細胞系において細胞増殖を促進することから、Cキナーゼが細胞増殖に深く関与していると考えられている[1]。またPDGFやEGF等の増殖因子の受容体は、ホスホリパーゼC γ をリン酸化してこれを活性化するため、これらの増殖因子による細胞機能発現にはCキナーゼも関与していることが示唆されている[10-13]。これらの増殖因子は、乳腺や初期卵胞内の顆粒膜細胞の増殖に関与していることから、これらの組織の発達にCキナーゼは深く関与していると想像される[17-19]。

第一章および前節から明らかなように、Cキナーゼを介した情報伝達による細胞機能の発現には、細胞膜と細胞質タンパク質の相互作用が重要な役割を果たしている。そこで本節では、Cキナーゼを介する細胞増殖におけるこれらの相互作用の重要性を明らかにすることを目的とし、マウス皮膚二段階発癌におけるTPAの発癌プロモーション作用をモデルとした。そして、Cキナーゼ阻害物質のひとつであるCepharanthineが[38]、TPAの発癌プロモーション作用を阻害することを見出し、その作用機序についてCキナーゼの基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用に対する効果から考察した。

1. 材料と方法

試薬

7,12-dimethylbenz[α]anthracene(以下DMBAと呼ぶ)は、ナカライテスクより購入した。卵黄 PhosphatidylcholineはSi-

gma社より購入した。H1 histone および TPA はそれぞれ Boe-
ringer社 および Pharmacia社より購入した。Cepharanthineは化
研生薬より分与をうけた。その他の試薬は第一章第二節および
第二章第二節に示したものを使用した。

二段階皮膚発癌

二段階皮膚発癌はNishinoらの方法を基準に行った[39]。す
なわち、雌性7週齢ICRマウスの背部をバリカンで剃毛し、二日
後200 μ lのAcetoneに溶解した100 μ gのDMBAを1回塗布した。
一週間後から週二回ずつ200 μ lのAcetoneに溶解した2.5 μ g
のTPAを塗布した。Cepharanthineは200 μ lのEthanol/Acetone
(1/1)に溶解し、TPA塗布 5分前に塗布した。対照はEthanol/
Acetone(1/1)を同様に塗布した。

C キナーゼの調整

C キナーゼは、第一章第二節の記述に従って、マウス脳より
調整した。

皮膚上皮細胞質タンパク質の調整

Ashendelらの方法に従って調整した[40]。すなわち、二日前
にバリカンで剃毛した8-12週齢の雄性マウスを頸椎脱臼で屠殺
後、背部の皮膚を切除し、氷上で真皮部分をメスで除去した。
残った皮膚上皮組織を、20 mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.15 M KCl、
1 mM PMSF、0.01% Leupeptin、2 mM EGTAからなるホモジネー
ション用緩衝液中でポリトロン型ホモジナイザーでホモジナイ
ズした。ナイロンメッシュで濾過した後、100,000 x gで1時
間遠心した。その上清分画を20 mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.15 M
KClで平衡化したゲル濾過カラム(Sephadex G-25)にかけ、ヌク

レオチド等低分子を除いたものを皮膚上皮細胞質タンパク質とした。

C キナーゼ活性の測定

C キナーゼ活性の測定は、リン脂質膜の濃度を1 mM (egg PCのみ、ないしはeggPC/PS=9/1 + 100 nM TPA)とし、第一章第二節の記述に従って行った。なおHistone type IIISとH1 histone およびProtamine sulfateの濃度は200 μ g/ml、細胞質タンパク質は1 mg/mlとし、反応時間は10分間とした。Protamine sulfateのリン酸化はリン脂質を除いて行った。

H1 histone のリン脂質膜への結合は、50 μ g/mlのH1 histoneを上記の活性測定法に従ってリン酸化した後、氷冷した当量の密度1.16のFicoll400溶液(20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.3 mM Ca^{2+} を含む緩衝液に溶解)と混合して反応を停止させた。そして、第一章第二節で述べたfloatation法により解析した。

リン脂質膜の調整

eggPCとPSを用いて作製した。Cloroform/Methanol=3:1に溶解したリン脂質を窒素ガス気流下で蒸発乾個し、100mM NaClを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5)緩衝液中に分散させた。この溶液を更に0°Cで60分間超音波処理し、10,000 x gで5分間遠心してその上清をリン脂質膜として使用した。

皮膚上皮細胞質タンパク質中の脂質分析

皮膚上皮細胞質タンパク質を、Cloroform/Methanol/Water=10:20:8で繰り返し抽出し、抽出物をCloroform/Metanol=10:9およびWaterの層に分配させて、有機溶媒層を脂質成分として回収した[41]。中性脂質分析は、Petroleum ether/Ethyl et-

Hex/Acetic acid=80:30:1、(vol/vol)を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行い、沃素で発色させた。リン脂質を含む極性脂質分析は、Chloroform/Methanol/Acetic acid/Water=100:60:16:8 (vol/vol)を展開溶媒として行った。展開後、リン脂質を Vaskovsky and Kosteskyの方法に従って、モリブデンで発色させ、600 nmの波長でデンシドメーターを用いて測定した[42]。

2. 結果

TPAによる発癌プロモーション作用に対するCepharanthineの阻害効果

DMBAによってイニシエーションされたマウスは、TPAによるプロモーション開始後5週間でパピローマの形成が始まり、10週でほぼ100%のマウスにパピローマの形成が見られた(図II-5A)。しかしCepharanthine塗布群は、18週においてもなおその形成は30%に止まった。また一匹あたりのパピローマ数も、18週でコントロール群の23と比べ4.8と著しく少なかった(図II-5B)。この阻害効果は、8週以降統計学的に有意であった($P < 0.01$)。またコントロール群の背部は炎症を起こしており、一部に壊死も見られたが、Cepharanthine塗布群ではそのような炎症は見られなかった。このように、CepharanthineはTPAによる発癌プロモーションに対して強い抑制効果を示した。

Cキナーゼ活性に対するCepharanthineの阻害作用

第一章で述べたように、TPAはCキナーゼと直接結合し活性化することから、TPAによる発癌プロモーションにはCキナーゼの活性化が関与していると考えられている。そこで、Ceph-

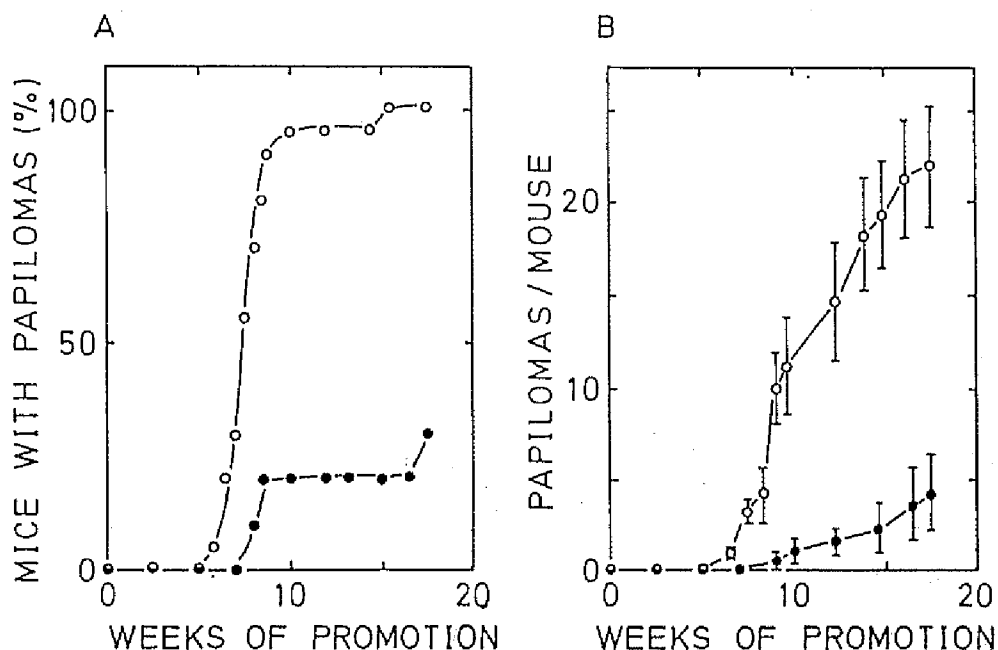


Fig.II-5. Inhibitory effect of cepharanthine on skin papilloma formation promoted by TPA. In cepharanthine applied group (closed circle, consisting of 10 mice), cepharanthine was applied topically 5 min before each promoter application. In control group (open circle, consisting of 20 mice), mice were applied the vehicle alone. (A), percentage of tumor-bearing mice; (B), average number of papillomas per mouse. Bars indicate \pm SEM. The cepharanthine applied group was statistically different from the control group after week 8 in both cases, $P < 0.01$ (A, Chi-square test; B, Student's t-test).

aranthineのCキナーゼ活性に対する効果を検討した。Cepharanthineは、H1 histoneとHistone type IIISのリン酸化を濃度依存的に阻害したが、その効果は両基質タンパク質に有意な差が見られた(図II-6)(20 μ M以上, $P < 0.01$)。また興味深いことに、リン酸化に Ca^{2+} 、リン脂質等を要求しない基質であるProtamine sulfateのリン酸化に対しては、Cepharanthineはほとんど効果を示さなかった(データは示さず)。これらの結果は、CepharanthineのCキナーゼ活性の阻害様式が、Cキナーゼの活性化そのものを阻害するものではないことを強く示唆している。

Cキナーゼの自己リン酸化に対するCepharanthineの効果

第一章で述べたように、Cキナーゼは活性化に伴って自己リン酸化する[43]。その程度は必ずしも基質タンパク質のリン酸化の程度と完全には一致しないが、Cキナーゼ活性化の指標とすることができる[44]。図II-7に示すように、 Ca^{2+} 、PSおよびTPA存在下にCキナーゼは自己リン酸化する。CepharanthineはこのCキナーゼの自己リン酸化を阻害せず、200 μ Mでは反って促進した。しかし Ca^{2+} 、PSおよびTPAが存在しない場合、Cepharanthine存在下ではCキナーゼは自己リン酸化しなかった。これらの結果は、CepharanthineはCキナーゼ活性化そのものに対しては阻害的に作用していないことを強く示唆している。

H1 histoneとリン脂質膜との相互作用に対するCepharanthineの効果

第一章で示したように、Cキナーゼのリン酸化活性は、Cキナーゼの活性化の他に基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用から大きな影響を受ける。そこで、Cキナーゼの基質タンバ

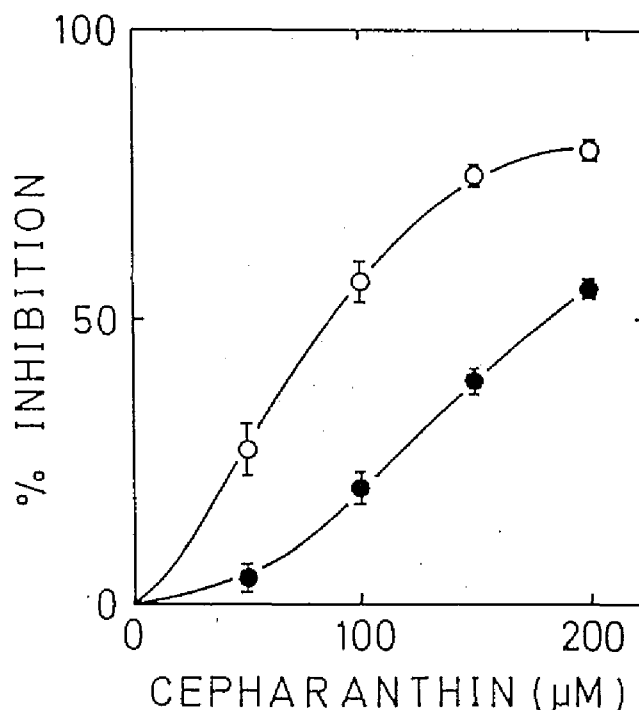


Fig.II-6. Inhibitory effect of cepharanthine on the phosphorylation of histone type IIIS and H1 histone by protein kinase C. Protein kinase C activity was assayed by measuring the incorporation of ^{32}P from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ into H1 histone (closed circle) or histone type IIIS (open circle) in the presence of $1\text{ }\mu\text{M Ca}^{2+}$ and 1 mM phospholipid (egg PC/PS = 9/1 + 100 nM TPA). Concentrations of both substrate proteins were $200\text{ }\mu\text{g/ml}$. The data are expressed as means \pm SEM of triplicate determinants. Above $20\text{ }\mu\text{M}$ cepharanthine, the inhibition of H1 histone phosphorylation was significantly different from that of histone type IIIS, $P < 0.01$ (Student's t-test).

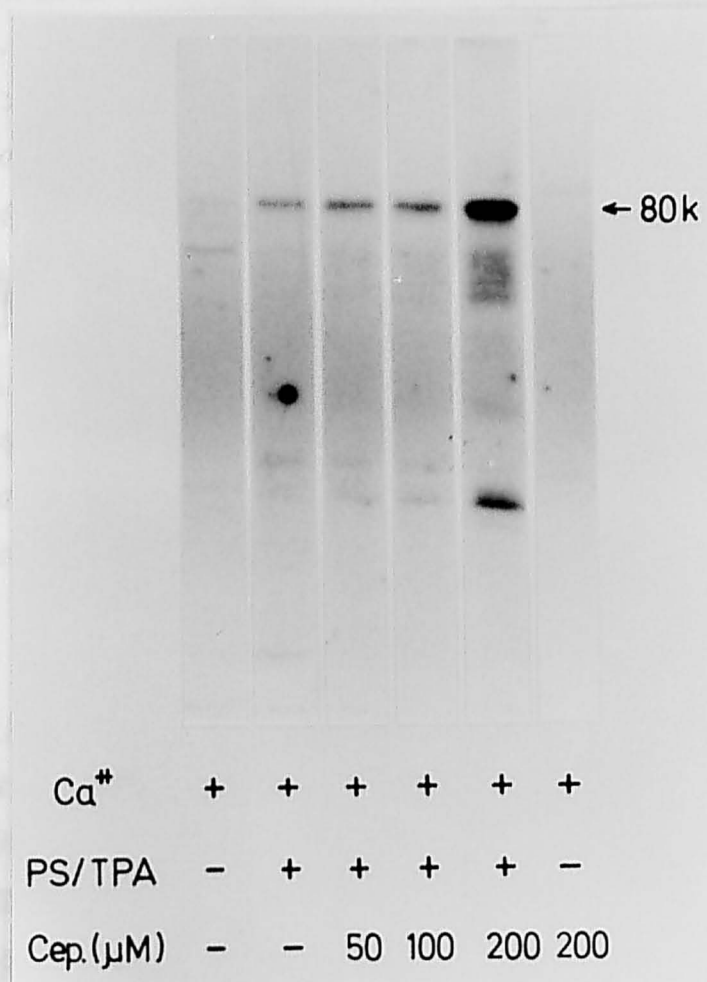


Fig.II-7.Effect of cepharanthine on autophosphorylation of protein kinase C. Protein kinase C was autophosphorylated without substrate proteins in the presence of 1 μ M Ca^{2+} and 1 mM phospholipid. In the absence of Ca^{2+} , 1 mM EGTA was added. The phosphorylation was analyzed by SDS-PAGE (10% gel) and autoradiography. The arrow indicates the position of protein kinase C. PS/TPA-, 1 mM egg PC; PS/TPA+, 1 mM egg PC/PS = 9/1 + 100 nM TPA.

ク質とリン脂質膜との相互作用に対する Cepharanthine の効果を検討した。H1 histone をリン酸化した後、膜結合タンパク質と非結合タンパク質を Ficoll 不連続密度勾配遠心法で分離した。図 II-8 にその結果を示す。H1 histone は、egg PC のみのリン脂質膜には結合せず、PS を含むリン脂質膜には結合した。そして Cepharanthine は濃度依存的にこの結合を阻害した。この結果は、Cepharanthine による C キナーゼの基質タンパク質のリン酸化阻害が、基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用の阻害によることを示唆している。一方リン酸化タンパク質の分布は、膜結合分画のみならず非結合分画にも存在し、その比は膜結合タンパク質の量と非結合タンパク質の量との比とよく平行していた。

マウス皮膚上皮細胞質タンパク質の内在性 C キナーゼによるリン酸化とそれに対する Cepharanthine の効果

そこで、発癌プロモーションにおける TPA の作用部位である皮膚上皮細胞のリン酸化に対して、Cepharanthine がどのような作用をするかについて検討した。図 II-9 に皮膚上皮細胞質タンパク質の内在性 C キナーゼによるリン酸化に対する Cepharanthine の作用を示した。90 k、85 k、60 k、50 k、45 k、31 kDa 等のタンパク質が Ca^{2+} 、PS および TPA に依存してリン酸化が上昇した。これらは内在性の C キナーゼによるものと考えられる。Cepharanthine はこれらのタンパク質のリン酸化を濃度依存的に阻害した。しかし Ca^{2+} 、PS および TPA に依存してリン酸化が上昇する 64 k、54 kDa タンパク質のリン酸化には、Cepharanthine の阻害作用は認められなかった。反対に C キナーゼあるいは C キナーゼの良い基質となる MARKS の分子量に相当する 80 kDa タンパクのリン酸化は、C キナーゼの自己リン酸化で

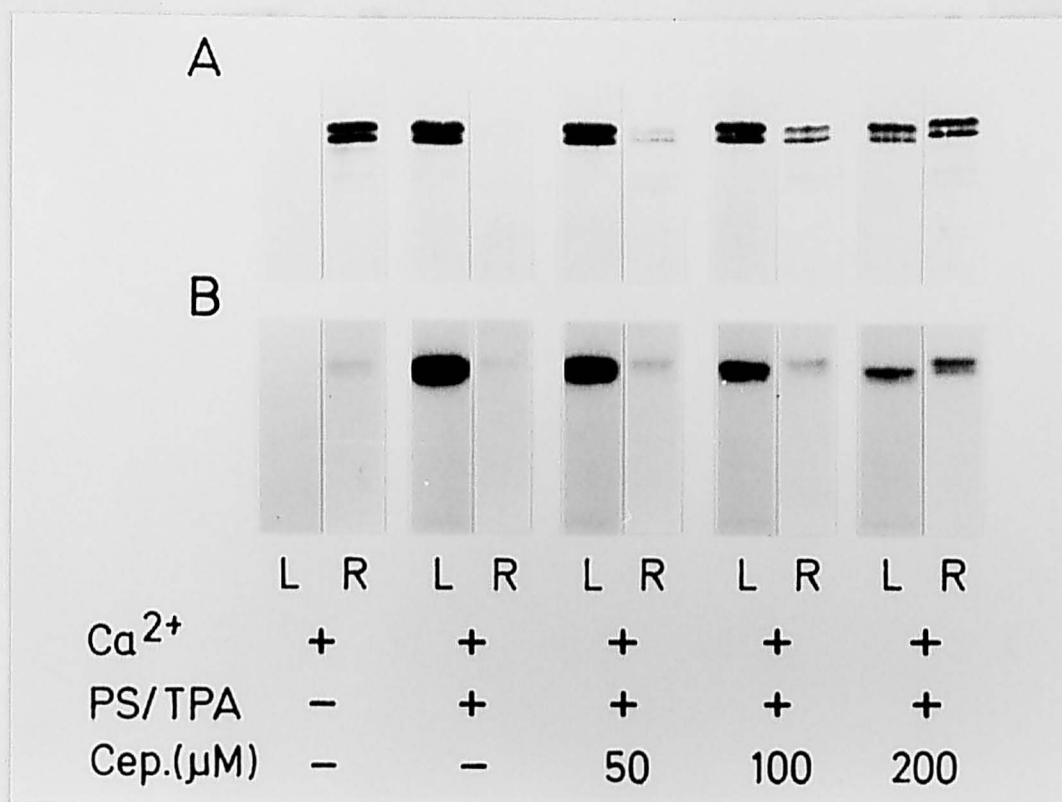


Fig.II-8. Inhibitory effect of cepharanthine on the interaction of H1 histone and phospholipid vesicles. H1 histone was phosphorylated by protein kinase C under the same conditions as Fig.II-6. Concentration of H1 histone was 50 μ g/ml. The phospholipid vesicles were separated by flotation method as described in materials and methods, and analyzed by SDS-PAGE (10% gel), and autoradiography. (A), silver stain; (B), autoradiography; Ca²⁺, 1 μ M Ca²⁺; PS/TPA-, 1 mM egg PC; PS/TPA+, 1 mM egg PC/PS = 9/1 + 100 nM TPA; L, liposome associated protein fraction; R, residual protein fraction.

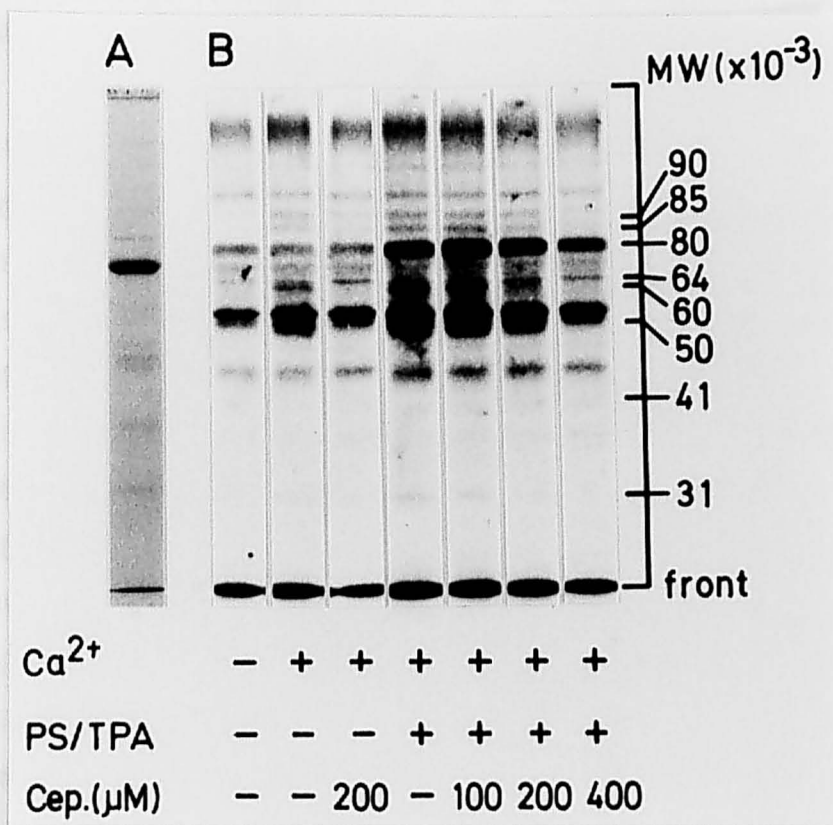


Fig.II-9.Effect of cepharanthine on the phosphorylation of mouse skin epidermal cytoplasmic proteins by endogeneous protein kinase C. CBB staining (A) and autoradiography (B) show the inhibitory effect of cepharanthine on phosphorylation of specific proteins in the presence of 1 μM Ca²⁺ and 1 mM phospholipid. The reaction was stopped by addition of SDS-PAGE sample buffer, and SDS-PAGE (10% gel) was performed. Ca²⁺-, 1 mM EGTA; Ca²⁺+, 1 μM Ca²⁺; PS/TPA-, 1 mM egg PC; PS/TPA+, 1 mM egg PC/PS = 9/1 + 100 nM TPA.

の結果と同様に Cepharanthine によって反って増大した。

これらの Ca^{2+} 、PS および TPA に依存して増大するリン酸化は、 Ca^{2+} のみ存在する場合でも弱いながら同様に観察された。そして Ca^{2+} のみに依存したこれらのリン酸化の増大も、Cepharanthine によって阻害された。この原因として、細胞質タンパク質中に C キナーゼの活性化因子が存在し、そのため Ca^{2+} 添加のみで内在性 C キナーゼを活性化している可能性が考えられる。そこで、 100°C で 3 分間熱処理をして変性させたマウス皮膚上皮細胞質タンパク質存在中で、マウス脳精製 C キナーゼが活性化されるか否か検討した。図 II-10 から明らかなように、熱変性細胞質タンパク質存在下に精製 C キナーゼは、 Ca^{2+} 添加でかなり強く Histone type IIIS をリン酸化し、その活性は Ca^{2+} 、PS および TPA 存在下の 60% 以上にも達した。一方熱変性細胞質タンパク質中には Histone type IIIS をリン酸化する活性は見られなかった。また熱変性細胞質タンパク質分画中には、Histone type IIIS のような C キナーゼの非常に良い基質は存在しないため、精製 C キナーゼの活性化による熱変性タンパク質のリン酸化は非常に低いものであった。以上の結果から、皮膚上皮細胞質タンパク質中に C キナーゼの活性化因子が存在することが明らかとなった。

次にこの活性化因子がどのようなものであるか検討した。 Ca^{2+} に依存して活性化することから、脂質成分であることが容易に推察される。図 II-11 に皮膚上皮細胞質タンパク質分画の脂質分析結果を示す。細胞質タンパク質分画中には PS と DG が相当量存在し、これが Ca^{2+} 依存性の C キナーゼ活性化因子として作用したものと推察された。

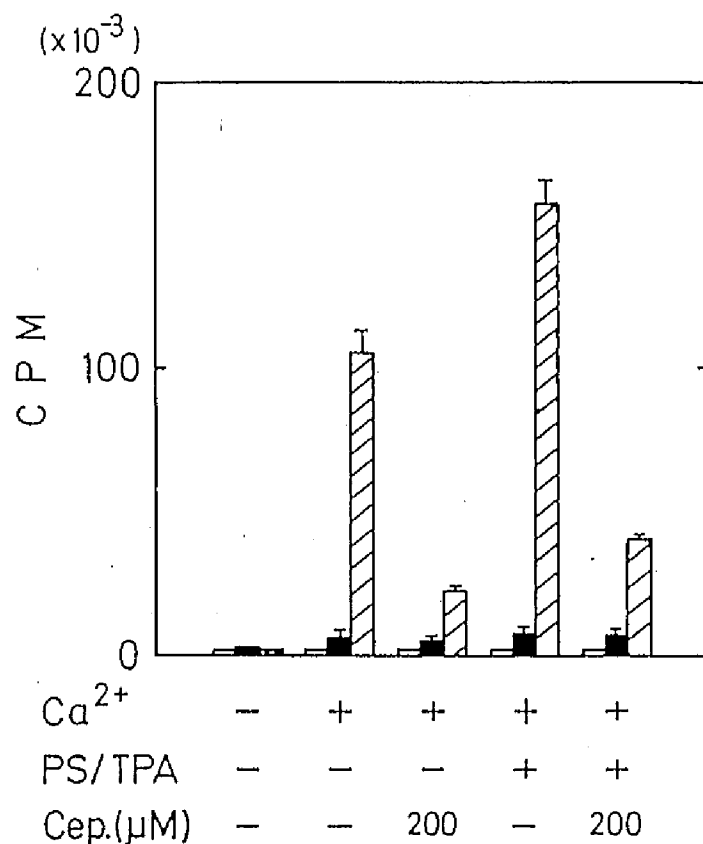


Fig.II-10. Activation of protein kinase C in heat denatured mouse skin epidermal cytoplasmic proteins in the absence of acidic phospholipid. Macromolecular fraction of mouse epidermal cytosol was denatured at 100 °C for 3 min. Protein kinase C was purified from mouse cerebral tissues. Histone type IIIS (200 μg/ml) was phosphorylated by protein kinase C in the presence of denatured cytosol fraction (1 mg/ml). Ca²⁺-, 1 mM EGTA; Ca²⁺+, 1 μM Ca²⁺; PS/TPA-, 1 mM egg PC; PS/TPA+, 1 mM egg PC/PS = 9/1 + 100 nM TPA; Open column, denatured cytosol + histone type IIIS; Closed column, protein kinase C + denatured cytosol; Hatched column, protein kinase C + denatured cytosol + histone type IIIS. The data are expressed as means+SEM of triplicate determinants.

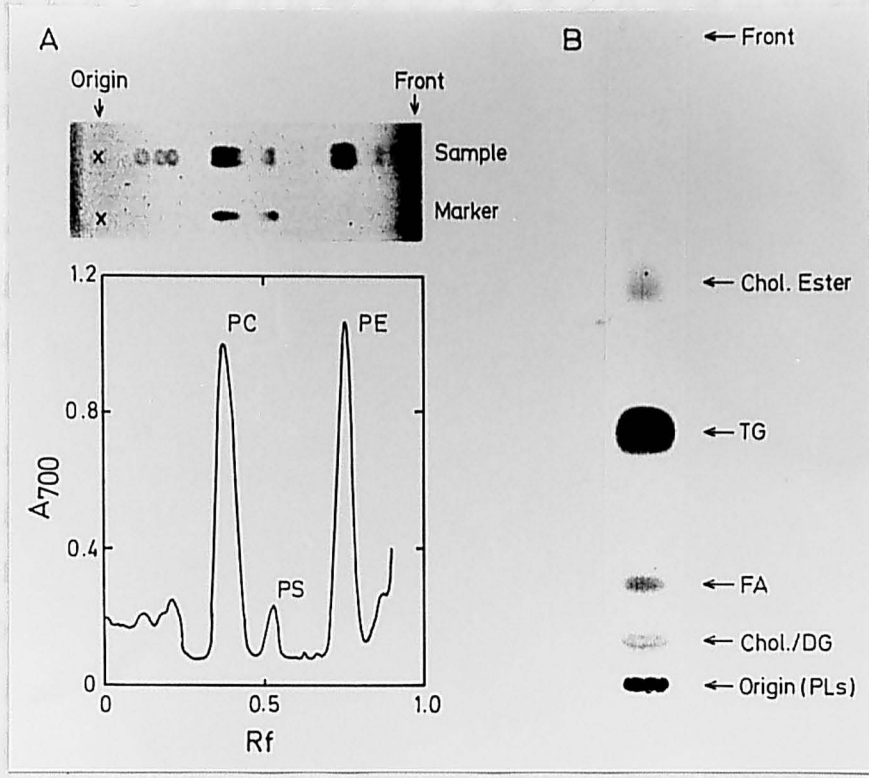


Fig.II-11.Distribution of lipids in skin epidermal cytosolic fraction. Distribution of lipids in mouse epidermal cytosol was analyzed by TLC. Extract of the cytosol fraction was developed in petroleum ether /ethyl ether/acetic acid (80/30/1: v/v) or in chloroform/methanol /acetic acid/water (100/60/16/8: v/v) for neutral lipids (A) or polar lipids (B), respectively. The lipids were visualized by iodine (A) or molybdate (B).

3. 考察

TPAは、*in vivo*および*in vitro*においてCキナーゼに直接結合してこれを活性化することから、TPAの発癌プロモーション作用にはCキナーゼの活性化によるタンパク質のリン酸化が重要な役割を果たしていると考えられている。実際幾つかのCキナーゼ阻害物質は、TPAの発癌プロモーション作用を阻害することが知られている[45]。Cキナーゼ阻害物質の中には正荷電を有する両親媒性物質があり[46-48]、Cepharanthineもそのグループに属する[49]。このグループに属する物質は負荷電の極性脂質と相互作用することから[50]、おそらくCepharanthineはPSのような負荷電のリン脂質と相互作用するものと考えられる。

第一章で示したように、Cキナーゼの基質タンパク質のリン酸化には基質タンパク質の膜への結合が必要である。Bazzyらは、SphingosineがHistoneによるPS含有リン脂質膜やTriton X-100との混合ミセルの凝集を強く阻害することを明らかにし、この作用がCキナーゼ活性を阻害する機構であることを示唆した[51]。Cepharanthineも基質タンパク質のリン脂質膜への結合を阻害し、その濃度依存性はリン酸化阻害の濃度依存性とよく平行していた。以上の結果や第一章の結果から、CepharanthineによるCキナーゼ活性の阻害は、基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用を阻害することによることが強く示唆された。

マウス皮膚上皮細胞質タンパク質の内在性Cキナーゼによるリン酸化に対するCepharanthineの効果を検討してみると、その効果は一樣ではなく、基質タンパク質の種類によって違うことが判明した。Cepharanthineは、基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用を阻害することによってリン酸化を阻害することから、おそらく各基質タンパク質の膜への結合様式やその強

さに違いがあるものと推察された。そしてCキナーゼによってリン酸化され、Cepharanthineによって阻害されるタンパク質の中に発癌プロモーションに関与しているタンパク質があるものと想像された。

以上のように、細胞の変異および増殖機構において、特定のCキナーゼの基質タンパク質と細胞膜との相互作用が重要な役割を演じており、Cepharanthineはそれを阻害することが強く示唆された。

第 四 節 ま と め

TPAは、種々の細胞に対して分化や増殖の誘導等、多彩な作用を持つことが知られている。本章ではTPAによる細胞の分化や増殖の生理学的機構を解析する新たなアプローチとして、第一章で検討した細胞膜と細胞質タンパク質の相互作用という観点からHL-60の分化と発癌プロモーションについて検討し、次の結果を得た。

TPAによるHL-60の分化は、Cキナーゼ阻害活性を有する分化阻害物質によってマクロファージに特徴的性質の発現が阻害されるが、Annexin Iの誘導は阻害されなかった。この結果は、これらの物質が分化を完全に阻害していないことを示唆している。TPAによるHL-60の分化には、17 kおよび27 kDaタンパク質のリン酸化とCキナーゼのダウンレギュレーションが関与していることが示唆されている。本研究では、17 kおよび27 kDaタンパク質のリン酸化を阻害するH-7や TFPといった物質[23,25]でも、TPAによるPKC β のダウンレギュレーションを阻害しないことを明らかにした。そしてこれらの物質がTPAによるPKC β のリン脂質膜への移行を阻害しないため、カルパインによるCキナーゼの分解を阻害しない可能性を示唆した。これらの結果は、細胞がCキナーゼを介した情報伝達によって分化する場合、Cキナーゼが活性化することだけでなく、Cキナーゼやカルパインの細胞膜への結合も、その後の分化に伴う細胞機能の発現に重要な役割を果たしていることを示唆している。

また、Cキナーゼの阻害物質であるCepharanthineは、TPAの発癌プロモーション作用を阻害した。そしてそのCキナーゼ阻害の機構は、Cキナーゼ自体の阻害ではなく、基質タンパク質のリン脂質膜への結合を阻害することによることが示唆された。

また Cepharanthine は、皮膚上皮細胞質タンパク質の C キナーゼによるリン酸化に対し、特定のタンパク質のリン酸化を阻害した。おそらくこれらのタンパク質の中に発癌プロモーションに関与するタンパク質があるものと想像された。以上の結果から、基質タンパク質の細胞膜への結合が C キナーゼを介した細胞の変異や増殖につながる情報伝達に重要であることが推察された。

このように、C キナーゼを介した情報伝達には C キナーゼの細胞膜への結合や基質タンパク質の細胞膜への結合が重要であり、また細胞機能の制御に、これらの細胞膜と細胞質タンパク質との相互作用の変化が重要な役割を果しているものと推察された。

引用文献

1. Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature, 308:693-698, 1984.
2. Cohn, R., Pacifici, M., Rubenstein, N., Biehl, J., and Holtzer, H. Effect of a tumour promoter on myogenesis. Nature, 266:538-540, 1977.
3. Pacifici, M., and Holtzer, H. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced changes in sulfated proteoglycan synthesis in cultured chondroblasts. Cancer Res. 40:2461-2464, 1980.
4. Mufson, R.A., Fisher, P.B., and Weinstein, I.B. Effect of phorbol ester tumor promoters on the expression of melanogenesis in B-16 melanoma cells. Cancer Res. 39:3915-3919, 1979.
5. Rovera, G., O'Brien, T.G., and Diamond, L. Tumor promoters inhibit spontaneous differentiation of Friend erythroleukemia cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2894-2898, 1977.
6. Fukuda, M. Tumor-promoting phorbol diester induced specific change in cell surface glycoprotein profile of K562 leukemic cells. Cancer Res. 41:4621-4628, 1981.
7. Pahlman, S., Odelstad, L., Larsson, G., Grotte, G., and Nilsson, K. Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Int. J. Cancer, 28:583-589, 1981.
8. Otte, A.P., Koster, C.H., Snoek, G.T., and Durston, A.J. Protein kinase C mediates neural induction in *Xenopus laevis*. Nature,

334:618-620,1988.

9. Dicker, P., and Rozengurt, E. Stimulation of DNA synthesis by tumour promoter and pure mitogenic factors. Nature, 276:723-726, 1978.
10. Sawyer, S.T., and Cohen, S. Enhancement of calcium uptake and phosphatidylinositol turnover by epidermal growth factor in A-431 cells. Biochemistry, 20:6280-6286, 1981.
11. Hirai, M., and Shimizu, N. Stimulation of a MR 800,000 protein phosphorylation by EGF in EGF receptor-hyperproducing human tumor cells. J. Cell. Physiol. 139:9-17, 1989.
12. Bjorge, J.D., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. Phorbol ester or epidermal growth factor (EGF) stimulates the concurrent accumulation of mRNA for the EGF receptor and its ligand transforming growth factor- α in a breast cancer cell line. J. Biol. Chem. 264:4021-4027, 1989.
13. Wahl, M.I., Daniel, T.O., and Carpenter, G. Antiphosphotyrosine recovery of phospholipase C activity after EGF treatment of A-431 cells. Science, 241:968-970, 1988.
14. Bjorge, D.J., and Kudlow, J.E. Epidermal growth factor synthesis is stimulated by phorbol ester and epidermal growth factor. J. Biol. Chem. 262:6615-6622, 1987.
15. Jinno, Y., Merlino, G., T., and Pastan, I. A novel effect of EGF on mRNA stability. Nucleic Acids Res. 16:4957-4966, 1988.
16. Bjorge, J.D., Kudlow, J.E., Mills, G.B. and Paterson, A.J. Inhibition of stimulus-dependent epidermal growth factor receptor and

- transforming growth factor- α mRNA accumulation by the protein kinase C inhibitor staurosporine. FEBS Lett. 243:404-408, 1989.
17. Okamoto, S., and Oka, T. Evidence for physiological function of epidermal growth factor: pregestational oophorectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6059-6063, 1984.
 18. Gospodarowicz, D., and Bialecki, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. Endocrinology, 104: 757-764, 1979.
 19. Ross, R., Raines, E.W., and Bowen-Pope, D.F. The biology of platelet-derived growth factor. Cell, 46:155-169, 1986.
 20. Collins, S.T. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. Blood, 70:1233-1244, 1987.
 21. Rovera, G., Santoli, D., and Damsky, C. Humane promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:2779-2783, 1979.
 22. Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Shiina, Y., and Suda, T. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages but not into granulocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117:86-92, 1983.
 23. Feuerstein, N., and Cooper, H.L. Rapid phosphorylation- dephospho-

- rylation of specific proteins induced by phorbol ester in HL-60. J. Biol. Chem. 259:2782-2788, 1984.
24. Merrill, A.H., Jr., Sereni, A.M., Stevens, V.L., Hannun, Y.A., Bell, R.M., and Kinkade, J.M., Jr. Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells by sphinganine and other long-chain bases. J. Biol. Chem. 261:12610-12615, 1986.
25. Nishikawa, M., Uemura, Y., Hidaka, H., and Shirakawa, S. 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), a potent inhibitor of protein kinases, inhibits the differentiation of HL-60 cells induced by phorbol diester. Life Sci. 39:1101-1107, 1986.
26. Simpson, R.U., Hsu, T., Wendt, M.D., and Taylor, J.M. 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ regulation of c-myc protooncogene transcription. J. Biol. Chem. 264:19710-19715, 1989.
27. Nishikawa, M., Komada, F., Uemura, Y., Hidaka, H., and Shirakawa, S. Decreased expression of type II protein kinase C in HL-60 variant cells resistant to induction of cell differentiation by phorbol diester. Cancer Res. 50:621-626, 1990.
28. Homma, Y., Henning-Chubb, C., and Huberman, E. Translocation of protein kinase C in human leukemia cells susceptible or resistant to differentiation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:7316-7319, 1986.
29. Solanki, V., Slaga, T.J., Callahan, M., and Huberman, E. Down regulation of specific binding of [20-³H]phorbol 12,13-dibutyrate and phorbol ester-induced differentiation of human promyelocytic

- leukemia cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1722-1725, 1981
30. Homma, Y., Gemmell, M.A., and Huberman, E. Protein kinase C activities with different characteristics, including substrate specificity, from two human HL-60 leukemia cell variants. Cancer Res. 48:2744-2748, 1988.
31. Kikkawa, U., Go, M., Koumoto, J., and Nishizuka, Y. Rapid purification of protein kinase C by high performance liquid chromatography. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135:636-643, 1986.
32. Sato, E., and Utsumi, K. Ca^{2+} -dependent phospholipid binding protein in guinea pig neutrophils: Its structure and function. Seikagaku, 61:661-680, 1989.
33. Shoji, M., Girard, P.R., Mazzei, G.J., Vogler, W.R., and Kuo, J.F. Immunocytochemical evidence for phorbol ester-induced protein kinase C translocation in HL-60 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135:1144-1149, 1986.
34. Perrela, F.W., Hellmig, B.D., and Diamond, L. Up regulation of the phorbol ester receptor-protein kinase C in HL-60 variant cells. Cancer Res. 46:567-572, 1986.
35. Zylber-Kats E., and Glazer, R. Phospholipid- and Ca^{2+} -dependent protein kinase activity and protein phosphorylation patterns in the differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. Cancer Res. 45:5159-5164, 1985.
36. Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M., and Nishizuka, Y. Proteolytic activation of calcium-dependent neutral protease. J Biol. Chem. 258:1156-1164, 1983.

37. Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, T., Tominaga, M., Kuroda, T., and Nishizuka, Y. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (Calpain). J. Biol. Chem. 264:4088-4092, 1989.
38. Matsuno, T., Orita, K., Edashige, K., Kobuchi, H., Sato, E.F., Inoue, B., Inoue, M., and Utsumi, K. Inhibition of active oxygen generation in guinea pig neutrophils by biscoclaurine alkaloids. Biochem. Pharmacol. 39: 1255-1259, 1990.
39. Nishino, H., Yoshioka, K., Iwashima, A., Takizawa, H., Konishi, S., Okamoto, H., Shibata, H., Fujiki, and Sugimura, T. Glycyrrhetic acid inhibits tumor-promoting activity of teleocidin and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate in two-stage mouse skin carcinogenesis. Jpn. J. Cancer. Res. 77:33-38, 1986.
40. Ashendel, C.L., Staller, J.M., and Boutwell, R.K. Identification of a calcium- and phospholipid- dependent phorbol ester binding activity in the soluble fraction of mouse tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 111:340-345, 1983.
41. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. & Physiol. 37:911-917, 1959.
42. Vaskovsky, V.E., and Kostetsky, E.Y. Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. J. Lipid. Res. 9:396-397, 1968.
43. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. J. Biol. Chem. 252:7603-7609, 1977.

44. Newton, A.C., and Koshland, D.K. High cooperativity, specificity, and multiplicity in the protein kinase C-lipid interaction. J. Biol. Chem. 264:14909-14915, 1989.
45. Nakadate, T., Yamamoto, S., Aizu, E., and Kato, R. Inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate-induced tumor promotion and epidermal ornithine decarboxylase activity in mouse skin by palmitoyl-carnithine. Cancer Res. 46:1589-1593, 1986.
46. Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H., and Bell, R.M. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. J. Biol. Chem. 261:12604-12609, 1987.
47. Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R., Yu, B., and Nishizuka, Y. Inhibitory action of chlorpromazine, dibucaine, and other phospholipid-interacting drugs on calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 255:8378-8380, 1980.
48. Schatzman, R.C., Wise, B.C., and Kuo, J.F. Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase: Inhibition by anti-psychotic drugs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 98:669-676, 1981.
49. Tomita, M., and Sasaki, Y. Studies on the alkaloids of menispermaceous plants. CXX. Cleavage of cepharanthine by metallic sodium in liquid ammonia. Pharmaceutical Bulletin, 2:375-378, 1954.
50. Lullmann, H., and Wehling, M. The binding of drugs to different polar lipids in vitro. Biochem. Pharmacol. 28:3409-3451, 1979.
51. Bazzy, M.D., and Nelstuen, G.L. Mechanism of protein kinase C inhibition by sphingosine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:203-207, 1987.

第 三 章 非ステロイド系抗エストロゲン剤によるCキナーゼ活性の阻害とその機構

第 一 節 緒 言

トリフェニルアクリロニトリル誘導体は、構造の類似性から抗エストロゲン作用を有するものがあり、エストロゲン受容体陽性の乳腺腫瘍や、下垂体前葉の機能障害による性腺刺激ホルモン低分泌型無排卵の治療に用いられている。その作用機序は、標的組織のエストロゲン受容体に対しエストロゲンと競合的に結合することによって、エストロゲン-エストロゲン受容体複合体の核内への移行を阻害することによって、エストロゲンの持つさまざまな生理学的な機能を阻害すると一般に考えられている[1-4]。代表的な排卵誘発剤であるClomipheneの作用機序は、視床下部のエストロゲン受容体に対しエストロゲンと拮抗し、見かけ上のエストロゲン濃度を減少させ、視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモンの放出を促すと考えられている。

最近、これらの抗エストロゲン剤がCキナーゼ阻害作用を有することが報告され、その阻害作用が抗エストロゲン剤の薬理作用に関与する可能性が示唆されている[5-9]。抗エストロゲン剤は、ヒト卵巣[5]、ヒト胎盤[5]、ラット脳[6-8]由来のCキナーゼによるHistoneのリン酸化を阻害することが報告されている。また抗エストロゲン剤の一種で乳腺癌の治療に使用されるTamoxifenは、その標的であるヒト乳腺腫瘍由来のMF-7細胞中のCキナーゼ活性を阻害することが報告されている[9]。またラット卵巣細胞質タンパク質の内在性Cキナーゼによるリン酸化も阻害することが報告されている[7]。Cキナーゼは、これまで述べてきたように、生体内での細胞膜を介した刺激伝

達に重要な役割を果していることから、これらの報告は、抗エストロゲン剤の作用機構にCキナーゼが関与していることを示唆している。

抗エストロゲン剤のCキナーゼ活性阻害の機序については幾つかの報告がある[6,8,10,11]。Cキナーゼによるリン酸化に Ca^{2+} もリン脂質も要求しない基質タンパク質であるProtamineのリン酸化に対し、抗エストロゲン剤の阻害作用が見られないことから、少なくともCキナーゼの触媒部位に対する直接的な阻害作用ではないことがすでに明らかにされている[6]。Cキナーゼは、その活性化にPS等酸性リン脂質を要求するが、抗エストロゲン剤のCキナーゼ阻害作用がPSの大量添加により消失することから、PSに対して拮抗していることが示唆されている[6,8]。またTamoxifen誘導体を担体としたアフィニティーカラムにCキナーゼが吸着することから、Cキナーゼの制御部位への結合を介した直接的な阻害作用も示唆されている[11]。しかしながら、PSとCキナーゼの制御部位との相互作用に抗エストロゲン剤が作用している証拠はなく、どういう機構でCキナーゼ活性が阻害されているかは不明である[10]。

そこで本章では、第一章の結果をもとに、Cキナーゼ活性に大きな影響を与えるリン脂膜と基質タンパク質との相互作用に対する非ステロイド系抗エストロゲン剤の効果から、これらの物質によるCキナーゼ阻害作用の機構を検討した。

第 二 節 材 料 と 方 法

試 薬

ClomipheneおよびTamoxifenはSigma社より購入した。その他の試薬は第一章第二節で述べた試薬を用いた。

リン脂質膜、Cキナーゼ、ラット乳腺および子宮細胞質タンパク質の調整

リン脂質膜およびCキナーゼは、第一章第二節で述べた方法に従って調整した。ラット乳腺および子宮の細胞質タンパク質は、第二章第三節をもとに調整した。すなわち、妊娠13日目のラット乳腺と発情前期のラット子宮を0.15 M KCl、1 mM PMSF、0.01% Leupeptin、2 mM EGTAを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液中でポリトロンホモジナイザーで破碎し、100,000 x gで60分間遠心し、その上澄みを0.15 M NaClを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5)で平衡化したShephadex G-25カラムにかけ、ヌクレオチド等低分子を除いたものを細胞質タンパク質とした。

Cキナーゼの活性測定

第一章第二節および第二章第三節で述べた方法に従って、液体シンチレーションカウント、およびX線フィルムの感光をデンスドメーター(600 nm)で測定することによって活性を測定した。

Histone type IIISとAnnexin Iのリン脂質膜への結合

第一章第二節で述べたflotation法をもとに測定した。すなわち200 μ M リン脂質膜(DPPCのみ、ないしはDPPC/PS=4/1 + 100nM TPA)と100 μ g/mlのタンパク質を30°Cで10分間反応さ

せ、当量の密度1.12のFicoll400溶液(100 mM NaClおよび反応液と同濃度の Ca^{2+} を含む20 mM Tris-HCl(pH 7.5)緩衝液に溶解)と混合し、密度1.05と1.01のFicoll400溶液(0.3 mM Ca^{2+} を含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5)緩衝液に溶解、1 mM EGTAと反応させた場合のみ1 mM EGTAを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5)緩衝液に溶解)を重ねて100,000 x g, 30°Cで1時間遠心し、リン脂質膜結合分画と非結合分画に分けた。それぞれの分画についてSDS-PAGEを行い、銀染色でタンパク質を検出した。

Annexin Iの検出

第二章第二節で述べた方法に準じて行った。一次抗体には抗モルモットAnnexin I ウサギ抗体、二次抗体には抗ウサギIgG ロバ抗体を用い、ルミノール化学発光によるX線フィルムの感光によって検出した。なお抗Annexin I抗体は、Annexin Iのみを認識し、他のAnnexinとは交叉反応しないことを予備実験で確かめた。

第 三 節 結 果

C キナーゼによる各種基質タンパク質のリン酸化に対する非ステロイド系抗エストロゲン剤の阻害作用

ClomipheneやTamoxifenのような抗エストロゲン剤がC キナーゼ活性を阻害することは、すでにいくつかの報告があるが、その阻害活性は研究者によってまちまちである[5-9]。抗エストロゲン剤の作用機序がPSとの拮抗阻害によるものと示唆されている[6,8,10]ことから、各報告でのリン脂質濃度の差によるものと考えられる[8]。そこで、100 nM TPA存在下でのC キナーゼの活性化におけるリン脂質の濃度依存性を求め、50% 活性化するリン脂質濃度を用いることにした。200 μ M リン脂質存在下のC キナーゼによるHistone type IIISのリン酸化活性を100% とした場合、リン脂質の50% 活性化濃度は17.5 μ Mであった(PSとして3.5 μ M)(データは示さず)。

次にこのリン脂質濃度での抗エストロゲン剤の効果について検討した。図III-1にその結果を示す。C キナーゼによるHistone type IIISのリン酸化に対して、ClomipheneもTamoxifenも共に濃度依存的に阻害した(図III-1A)。その50% 阻害濃度(K_i)はそれぞれ40 μ Mと50 μ Mであった。Protamine sulfateのリン酸化に対しては、200 μ Mまで両薬剤とも阻害をしなかった。これらの結果はO'Brianらの報告と一致する[6]。

一方、図III-1Bに示したAnnexin IのC キナーゼによるリン酸化においては、これらの薬剤はHistone type IIISの場合と同様に濃度依存的に阻害したが、その感受性はHistone type IIISと比較して著しく高く、 K_i 値は両薬剤とも1.5 μ Mであった。これら結果は抗エストロゲン剤がC キナーゼそのものを阻害していないことを強く示唆している。

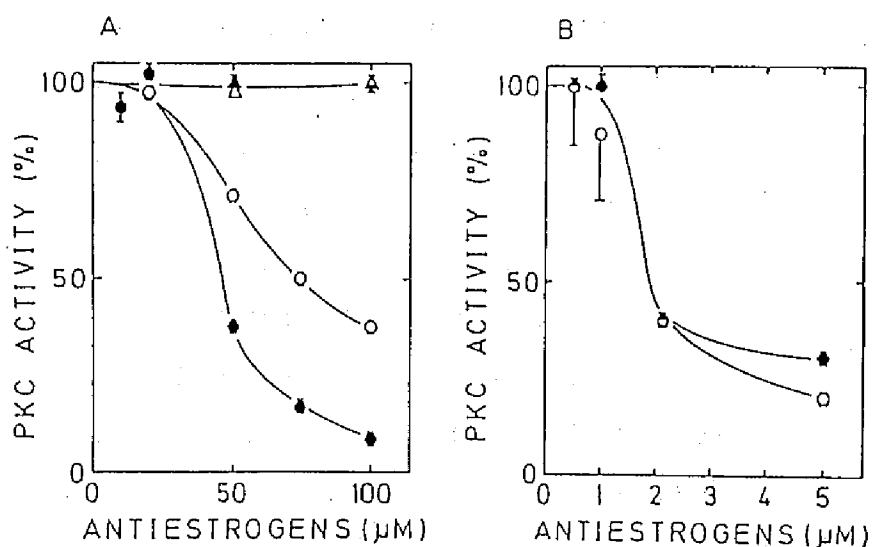


Fig.III-1.Effect of antiestrogens on the phosphorylation of various proteins by protein kinase C. Reaction was performed in the presence (histone type IIIS and annexin I) or absence (protamine sulfate) of 17.5 μ M phospholipid (DPPC/PS=4/1 + 100 nM TPA). Concentrations of the substrates were 200 μ g/ml. circle; histone type IIIS (A) or annexin I (B), triangle; protamine sulfate, closed symbol; tamoxifen, open symbol; clomiphene. The data indicate as means \pm SEM of triplicate determinants.

抗エストロゲン剤の基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用に対する効果

抗エストロゲン剤は、PSに対して拮抗することがすでに明らかになっていることから、抗エストロゲン剤の阻害機構がリン脂質膜に対する作用を介していることが推察されている。前章で述べたように、いくつかの両親媒性のCキナーゼ阻害剤は正電荷を有している。抗エストロゲン剤も中性域では正電荷を有しており、前章のCepharantineの場合と同様に基質タンパク質とPSを含むリン脂質膜との相互作用を阻害することが推察される[12,13]。そこで、Histone type IIISとAnnexin Iのリン脂質膜との相互作用に対するTamoxifenの効果を検討した。なおリン脂質量は flotation法によるタンパク質との結合解析を行うために200 μ Mとした。その結果を図III-2、図III-3に示す。Histone type IIISはPSに依存してリン脂質膜と結合するが、Tamoxifenは濃度に依存してこの結合を阻害し、100 μ Mで50%程度、200 μ Mでほぼ完全に阻害した(図III-2B)。この条件下でのCキナーゼによるHistone type IIISのリン酸化に対する阻害効果は、図III-1Aに比較してリン脂質濃度が高いためにかなり低くなっているが、その K_i 値は125 μ Mであり、また200 μ Mの濃度で80%の阻害を示した。この値はHistone type IIISのリン脂質膜への結合阻害の濃度依存性と平行していた。一方Annexin Iは、 Ca^{2+} とPSに依存してリン脂質膜に結合し、Tamoxifenの濃度に依存して阻害された(図III-3B)。そしてCキナーゼによるAnnexin Iのリン酸化に対するTamoxifenの阻害効果は、図III-2Aと同様にリン脂質濃度が高いために図III-1Bと比較して低くなっているが、 K_i 値が23 μ MとHistone type IIISよりかなり低かった(図III-3A)。そしてTamoxifenによるAnnexin Iのリン脂質膜結合阻害の濃度依存性と、Cキナーゼによ

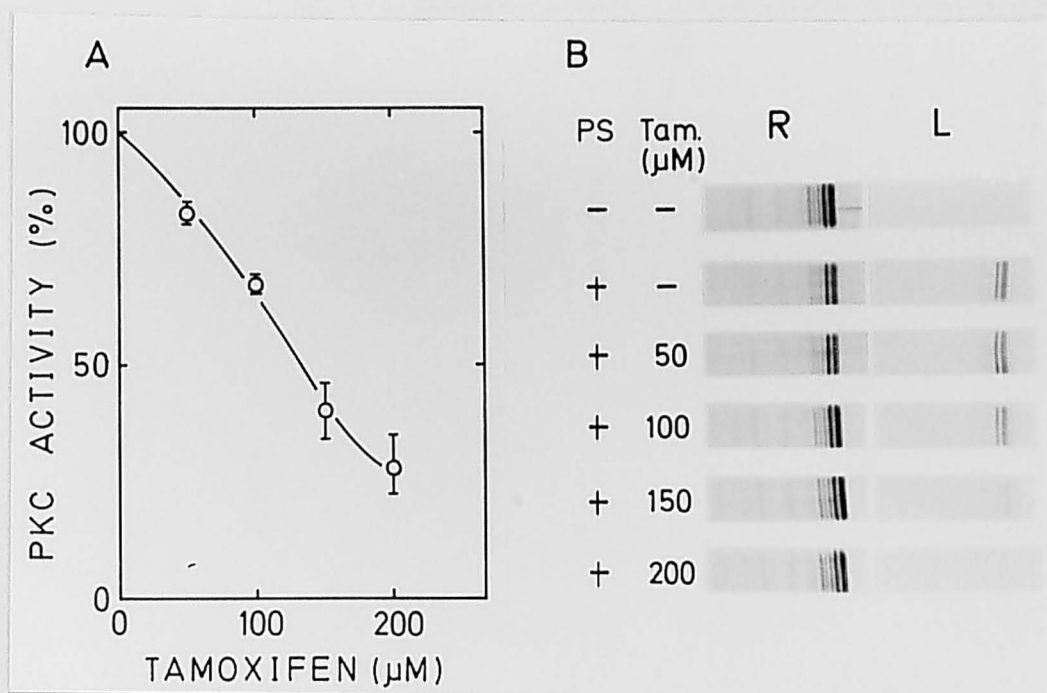


Fig.III-2.Effect of tamoxifen on the interaction of histone type IIIS with phospholipid membranes. Inhibitory effects of tamoxifen on the phosphorylation of histone type IIIS by protein kinase C (A), and on the association of histone type IIIS with phospholipid membranes (B) were assayed in the presence of 0.3 mM Ca^{2+} and 200 μM phospholipid as described in "materials and methods". Extent of association of histone with phospholipid membrane was expressed as a figure of silver staining following SDS-PAGE (15% gel), and that of phosphorylation of histone type IIIS was assayed by scintillation counting. PS-, 200 μM DPPC; PS+, 200 μM DPPC/PS = 4/1 + 100 nM TPA; L, membrane-associated fraction; R, residual protein fraction. Bars indicate \pm SEM of triplicate determinants.

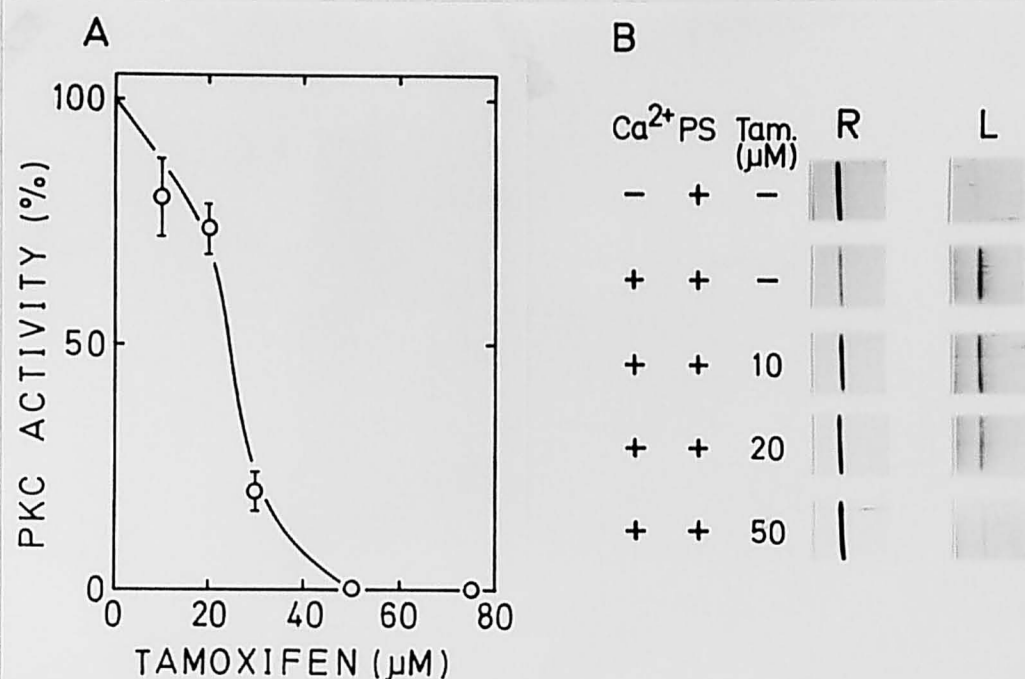


Fig.III-3.Effect of tamoxifen on the interaction of annexin I with phospholipid membrane. Inhibitory effects of tamoxifen on the phosphorylation of annexin I by protein kinase C (A), and on the association of annexin I with phospholipid membranes (B) were assayed in the presence of 200 μ M phospholipid as described in "materials and methods". Extent of association of annexin I with phospholipid membranes was expressed as a figure of silver staining following SDS-PAGE (12% gel), and that of phosphorylation was assayed by measuring the density of autoradiographs at 600 nm. Ca²⁺-, 1 mM EGTA; Ca²⁺+, 0.3 mM Ca²⁺; PS+, 200 μ M DPPC/PS = 4/1 + 100 nM TPA; L, membrane-associated fraction; R, unassociated protein fraction. Bars indicate \pm SEM of triplicate determinants.

るリン酸化の阻害のそれとはよく平行していた。これらの結果から、抗エストロゲン剤によるCキナーゼの阻害効果は、基質タンパク質のリン脂質膜への結合阻害を介して起こっていることが強く示唆された。

細胞質タンパク質の内在性Cキナーゼによるリン酸化に対する抗エストロゲン剤の効果

抗エストロゲン剤の組織内での効果を検討するために、エストロゲンの標的組織である乳腺と子宮の細胞質タンパク質を用い、これらの内在性Cキナーゼによるリン酸化に対する抗エストロゲン剤の効果を検討した。なおリン脂質濃度は200 μ Mを用いた。図III-4は妊娠13日目のラット乳腺細胞質タンパク質のリン酸化像を示している。 Ca^{2+} のみの添加により、86-80 k、70 k、56 k、53 k、45 k、37 k、および17 kDaタンパク質のリン酸化が増大した。乳腺細胞質タンパク質は、前章の皮膚上皮細胞質タンパク質と同様にCキナーゼの活性化因子を含んでいた(100°Cで3分間で熱変性させた細胞質タンパク質は、精製CキナーゼによるHistone type IIISのリン酸化を Ca^{2+} のみの添加で30-40%活性化した。データは示さず)ことから、おそらくこのリン酸化のかなりの部分はCキナーゼに依存していると考えられる。さらにPSおよびTPAの添加により、これらのタンパク質のリン酸化がさらに増大した。そしてClomipheneやTamoxifenはこれらのリン酸化を30-75 μ Mの濃度で強く阻害した。しかしながら、 Ca^{2+} 、PSおよびTPAの添加によりリン酸化が増大した86-80kおよび22 kDaタンパク質のリン酸化は、これらの抗エストロゲン剤を150 μ M添加しても阻害されなかった。

ラット子宮細胞質タンパク質の場合は、 Ca^{2+} 、PSおよびTPAの添加により100 k、86-80 k、70 k、60 k、56 k、37-35 k、

および23 kDaタンパク質のリン酸化が増大した(図III-3)。これらのリン酸化の大半が、30-75 μ Mの抗エストロゲン阻害で強く阻害された。しかしながら、30-300 nMおよび23 kDaタンパク質のリン酸化は、 Ca^{2+} 、PSおよびTPAによってリン酸化が増大することからCキナーゼに依存していると考えられるのにもかかわらず、抗エストロゲン阻害によってまったく阻害されなかった。これらのリン酸化タンパク質の性質やその発現については不明であるが、おそらく主要な組織で*Annexin*に属するタンパク質が

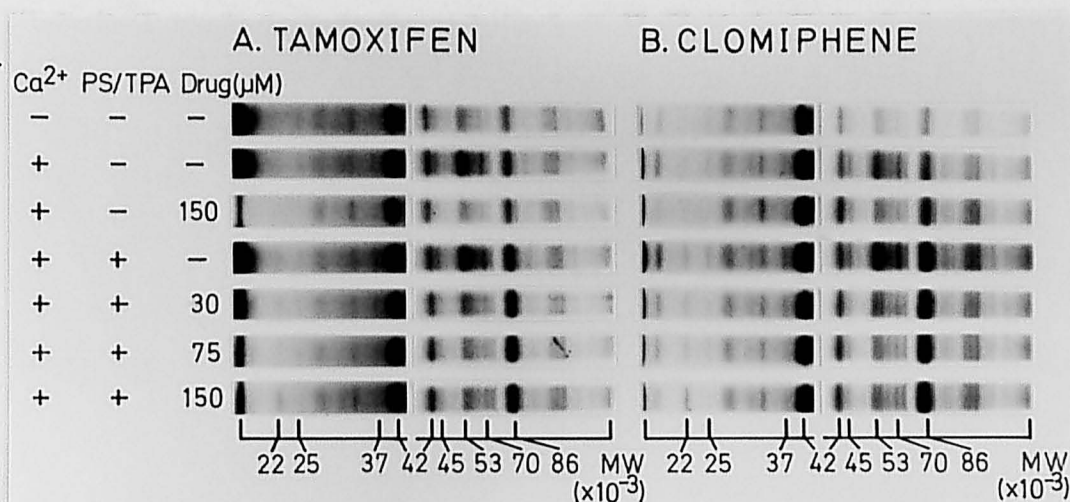


Fig.III-4.Effect of antiestrogens on the phosphorylation of mammary gland cytoplasmic proteins by endogenous protein kinase C. Inhibitory effect of clomiphene (A) and tamoxifen (B) on the protein kinase C-dependent phosphorylation of cytoplasmic proteins obtained from rat mammary gland was analyzed by autoradiography. The reaction was stopped by addition of SDS-PAGE sample buffer followed by SDS-PAGE (10% gel). Ca^{2+} -, 1 mM EGTA; Ca^{2+} +, 0.3 mM Ca^{2+} ; PS/TPA-, 200 μ M DPPC; PS/TPA+, 200 μ M DPPC/PS = 4/1 + 100 nM TPA

および 23 kDa タンパク質のリン酸化が増大した (図 III-5)。これらのリン酸化の大半が、30-75 μ M の抗エストロゲン剤で強く阻害された。しかしながら、86-80 kDa および 23 kDa タンパク質のリン酸化は、 Ca^{2+} 、PS および TPA によってリン酸化が増大することから C キナーゼに依存していると考えられるのにもかかわらず、抗エストロゲン剤によってまったく阻害されなかった。

これらのリン酸化タンパク質の種類やその性質については不明であるが、さまざまな組織で Annexin に属するタンパク質が検出されていることから、これらの臓器にも存在することが推察される。そこで、Annexin I が乳腺および子宮に分布するかどうか検討した。図 III-6 にその結果を示す。SDS-PAGE 上での分子量がモルモット Annexin I (35 kDa) よりやや高い 37 kDa の位置に、抗 Annexin I 抗体と反応するタンパク質が検出され、ラット乳腺および子宮の細胞質中にも Annexin I が存在することが確認された。同じ 37 kDa の分子量で、 Ca^{2+} 、PS および TPA 依存的にリン酸化されるタンパク質がラット乳腺にも子宮細胞質にも存在し、これらのリン酸化が Annexin I のリン酸化阻害濃度に相当する 30-75 μ M の抗エストロゲン剤で強く阻害されたことから、C キナーゼによる乳腺および子宮の 37 kDa タンパク質のリン酸化の一部には、Annexin I のリン酸化が含まれていることが想像された。

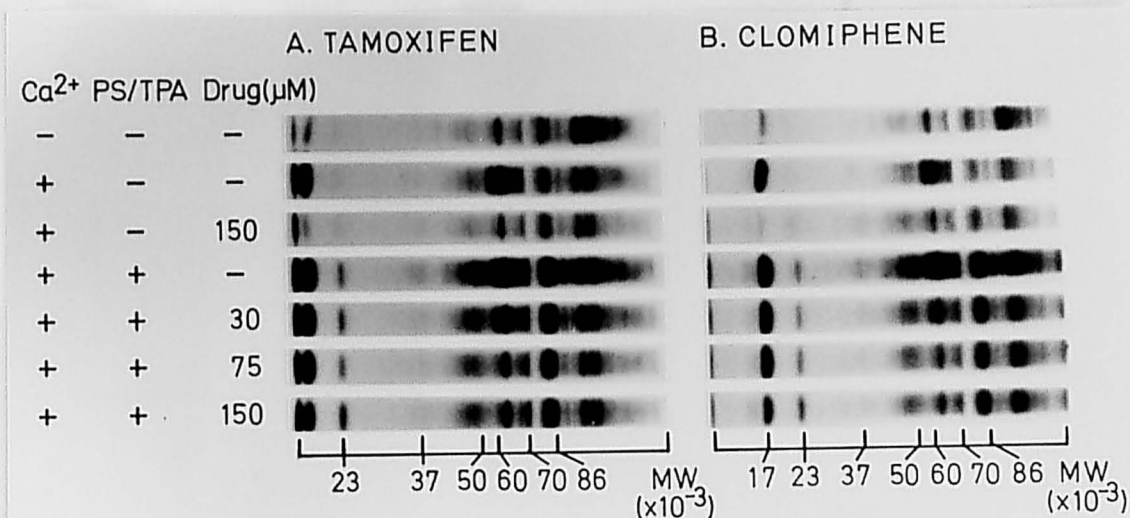


Fig.III-5.Effect of antiestrogens on the phosphorylation of uterus cytoplasmic proteins by endogenous protein kinase C. Inhibitory effect of clomiphene (A) and tamoxifen (B) on the protein kinase C-dependent phosphorylation of cytoplasmic proteins obtained from rat uterus was analyzed by autoradiography. The experimental conditions were same as Fig.III-4. Ca²⁺-, 1 mM EGTA; Ca²⁺+, 0.3 mM Ca²⁺; PS/TPA-, 200 μM DPPC; PS/TPA+, 200 μM DPPC/PS = 4/1 + 100 nM TPA

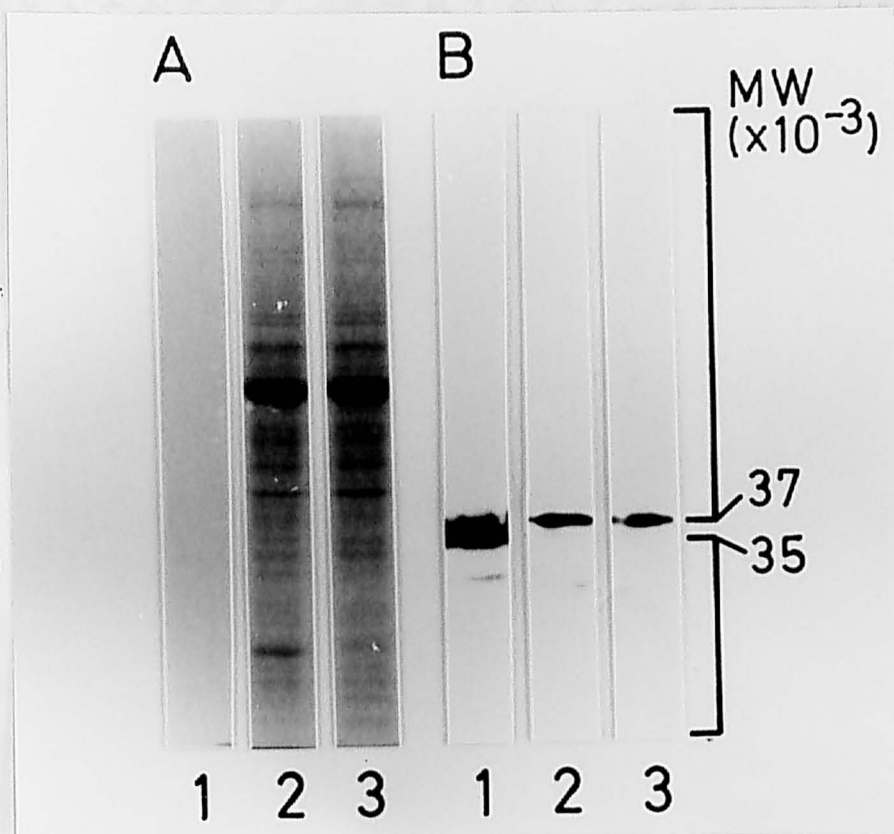


Fig.III-6.Presence of annexin I in rat mammary gland and uterus. Presence of annexin I in the cytosol obtained from rat mammary and uterus was determined by SDS-PAGE (10% gel) and Immunoblotting. (A)Coomassie brilliant blue staining. (B) electroblotted onto PVDF membrane and immunostained with rabbit antibody against annexin I. lane 1, annexin I (1 μ g protein); lane 2, rat mammary gland cytosol (50 μ g protein); lane 3, rat uterus cytosol (50 μ g protein).

第 四 節 考 察

抗エストロゲン剤の作用機序は、一般にはエストロゲン受容体に対してエストロゲンと拮抗することによってその薬理学的作用を発現しているものと考えられている[1-4]。しかし乳腺癌由来のMF-7細胞に対する作用については、必ずしも大量のエストロゲン添加によって抗エストロゲン剤の作用が打ち消されないことが報告されている[14,15]。また、すでにエストロゲン受容体以外の抗エストロゲン剤の結合部位が、エストロゲンの標的組織の内外に存在することが確かめられている[16,17]。最近、抗エストロゲン剤がCキナーゼ阻害作用を有することが報告され、Cキナーゼもこれらの薬剤の作用点のひとつと考えられている[5-9]。Cキナーゼに対するこれらの薬剤の作用は、大量のPSの添加によって消失し[6,8]、 Ca^{2+} 、PSおよびTPAを要求しないCキナーゼの基質タンパク質であるProtamineのリン酸化には阻害効果はなく[6]、またCキナーゼはTamoxifenの誘導体を担体に用いたカラムに吸着する[11]。Pignonらは、抗エストロゲン剤のCキナーゼ阻害作用の作用機序を以下のように推論した[10]。すなわち、抗エストロゲン剤はCキナーゼの触媒部位には結合せず、PSないしはCキナーゼの制御部位に結合することによってCキナーゼを阻害する。しかしCキナーゼとの直接的な相互作用はPSとのそれより弱くゆっくりとしている。また抗エストロゲン剤がPSとCキナーゼの制御部位との相互作用に作用している証拠はないとし、主な作用点がPSであることを強く示唆した。しかしながら、これらの物質のPSとの結合がどういう機構でCキナーゼ活性を阻害するか不明であった。

本研究で抗エストロゲン剤はCキナーゼによるHistone type IIISおよびAnnexin Iのリン酸化を阻害したが、その感受性

には 5-30 倍の差があった。この結果は、抗エストロゲン剤の作用機序が C キナーゼに対する直接作用ではないことを示唆している。第一章および本章から明らかにように、Histone type IIIS は PS を介してリン脂質膜と結合し [18, 19]、Annexin I も PS と Ca^{2+} に依存してリン脂質膜に結合する [20, 21]。Tamoxifen による両基質タンパク質の C キナーゼによるリン酸化の阻害、および PS と Ca^{2+} に依存したリン脂質膜への結合の阻害を比較すると、両タンパク質ともよく関連していた。

第一章や第二章第三節で示したように、C キナーゼの基質タンパク質のリン酸化には、基質タンパク質の膜への結合が必要であることから、非ステロイド型抗エストロゲン剤の C キナーゼ阻害の機構は、主に基質タンパク質とリン脂質膜との PS を介した相互作用の阻害によることが強く示唆された。そして Histone type IIIS と Annexin I の C キナーゼによるリン酸化に対する抗エストロゲン剤の感受性の違いは、両タンパク質の PS 含有リン脂質膜への親和性の違いによるものと推察された。

Clomiphene も Tamoxifen もラット乳腺および子宮の細胞質タンパク質の内在性 C キナーゼによるリン酸化の多くを比較的 low 濃度で阻害した。これらのリン酸化タンパク質の種類や性質はまったく不明ではあるが、少なくともそれらの中には Annexin I が含まれている可能性が示唆された。Rocha らは、ラット乳腺中に Annexin II (36 kDa)、IV (32 kDa)、VI (70 kDa) が存在することを報告している [22]。これらの Annexin は in vitro で C キナーゼの基質となることが知られている [23-26]。また Kaetzel らはラット子宮および卵巣に Annexin III (35 kDa)、IV、V (35 kDa) が存在することを報告している [27]。子宮組織の大部分は平滑筋であることから、おそらく筋組織に含まれる Annexin VI も存在すると推察される [28]。これらの Annexin のうち、

上記のように Annexin IV、VIがCキナーゼによってリン酸化される。乳腺および子宮の細胞質タンパク質のCキナーゼによるリン酸化において、Annexin IV、VIと分子量が近似したタンパク質のリン酸化が見られることから、乳腺および子宮においてもこれらのAnnexinがCキナーゼによりリン酸化され、抗エストロゲン剤によってそのリン酸化が強く阻害されていることが想像される。

一方Cキナーゼによる乳腺の22 kDa、子宮の23 kDa、両組織の86-80 kDaタンパク質のリン酸化は、抗エストロゲン剤によってまったく阻害されなかった。おそらくこれらのタンパク質の膜結合様式が他のタンパク質と違うため、抗エストロゲン剤によってこれらのタンパク質とリン脂質膜との相互作用は影響されなかったものと想像される。

非ステロイド系抗エストロゲン剤のCキナーゼに対する K_i 値は、報告によりかなり異なっているが[5-9]、いずれもmicro molarの濃度である。一方エストロゲンとの拮抗作用は nano molarの濃度であることから、エストロゲンとの拮抗によると考えられる作用にはCキナーゼ阻害作用は関与しないと考えられてきた。これまで抗エストロゲン剤のCキナーゼ阻害作用はHistoneを基質として研究されてきた。本研究で、細胞質タンパク質の一つであるAnnexin Iを基質とした場合、Histone type IIISと比較して K_i 値が $1/5-1/30$ であることを明らかにした。また乳腺や子宮の細胞質タンパク質の内在性Cキナーゼによるリン酸化の阻害濃度が、Annexin Iのそれと近似していることも明らかにした。過去の報告における抗エストロゲン剤のHistoneを基質とした場合の最も低い K_i 値は $1-2 \mu M$ であることから、抗エストロゲン剤は、条件によっては nano molarの濃度でCキナーゼによる細胞内タンパク質のリン酸化を阻害する可

能性がある。

Clomipheneは脳下垂体前葉からの性腺刺激ホルモンの放出を引き起こす。その作用を起こす血中濃度はnano molarのオーダーであることから、その作用機序はエストロゲンに対する拮抗作用と考えられてきた。近年脳下垂体前葉の初代培養細胞を用いた実験から、性腺刺激ホルモン分泌を促すGn-RHが細胞のイノシトールの代謝回転を高めることが報告された[29,30]。またTPAがこの細胞からのLHの分泌を引き起こすことから、Gn-RHによるLHの分泌にCキナーゼの活性化が関与して可能性が示唆されている。もしClomipheneがnano molarのオーダーで脳下垂体前葉の特定の細胞質タンパク質のリン酸化が阻害するならば、Clomipheneの性腺刺激ホルモン分泌の誘起作用にはCキナーゼを介した別の機構が存在することになる。この点についてはさらなる検討が必要である。

引用文献

1. Pearson, O.H., Manni, A. and Arafah, B.M. Antiestrogen treatment of breast cancer: An overview. Cancer Res. 42:3424-3429, 1982.
2. Lippman, M.E., Bolan, G., and Huff, K., K. The effect of estrogen and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long term tissue culture. Cancer Res. 36:4595-4601, 1976.
3. Coezy, E., Borgana, J.L., and Rochefort, H. Tamoxifen and metabolites in MCF-7 cell: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. Cancer Res. 42:317-327, 1982.
4. Reddel, R.R., Murphy, L.C., and Sutherland, R.L. Effects of biologically active metabolites of tamoxifen on the proliferation kinetics of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. Cancer Res. 43:4613-4624, 1983.
5. Eyster, K.M., and Clark, M.R. Nonsteroidal antiestrogen inhibition of protein kinase C in human corpus luteum and placenta. Biochem. Pharmacol. 38:3497-3503, 1989.
6. O'Brian, C.A., Liskamp, R.M., Solomon, D.H., and Weinstein, I.B. Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. Cancer Res. 45:2462-2465, 1985.
7. Su, H., Mazzei, G., Vogler, W.R., and Kuo, J.F. Effect of tamoxifen, a nonsteroidal antiestrogen, on phospholipid/calcium-dependent protein kinase and phosphorylation of its endogenous substrate proteins from the rat brain and ovary. Biochem. Pharmacol. 34:3649-3653, 1985.

8. Bignon, E., Ogita, K., Kishimoto, A., Gilbert, J., Abecassis, J., Miquel, J., and Nishizuka, Y. Mode of inhibition of protein kinase C by triphenylacrylonitrile antiestrogens. Biochem. Biophys. Res. Commun. 163:1377-1383, 1989.
9. Bignon, E., Ogata, K., Kishimoto, A., and Nishizuka, Y. Protein kinase C subspecies in estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171:1071-1078, 1990.
10. Bignon, E., Pons, M., Gilbert, J., and Nishizuka, Y. Multiple mechanisms of protein kinase C inhibition by triphenylacrylonitrile antiestrogens. FEBS Lett. 271:54-58, 1990.
11. O'Brian, C.A., Housey, G.M., and Weinstein, I.B. Specific and direct binding of protein kinase C to an immobilized tamoxifen analogue. Cancer Res. 48:3626-3629, 1988.
12. Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R., Yu, B., and Nishizuka, Y. Inhibitory action of chlorpromazine, dibucaine, and other phospholipid-interacting drugs on calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 255:8378-8380, 1980.
13. Schatzman, R.C., Wise, B.C., and Kuo, J.F. Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase: Inhibition by anti-psychotic drugs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 98:669-676, 1981.
14. Sutherland, R.L., Green, M.D., Hall, R.E., Reddel, R.R., and Taylor, I.W. Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19:615-621, 1983.

15. Sutherland, R.L., Hall, R.E., and Taylor, I.W. Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau phase cells. Cancer Res. 43:3998-4006, 1983.
16. Sutherland, R.L., Murphy, L.C., Foo, M.S., Green, M.D., Whybourne, A.M., and Krozowski, Z.S. High-affinity antioestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. Nature 288:273-275, 1980.
17. Sudo, K., Monsma, F.J. Jr., and Katzenellenbogen, B.S. Antiestrogen binding site distinct from the estrogen receptor: subcellular localization, ligand specificity, and distribution in tissues of the rat. Endocrinology 112:425-434, 1983.
18. Edashige, K., and Utsumi, T., and Utsumi, K. Inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate promoted tumorigenesis by cepharanthine, a biscochlorine alkaloid, in relation to the inhibitory effect on protein kinase C. Biochem. Pharmacol. 41:71-78, 1991.
19. Bazzy, M.D., and Nelstuen, G.L. Mechanism of protein kinase C inhibition by sphingosine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:203-207, 1987.
20. Schlaepfer, D.D., and Haigler, H.T. Characterization of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. J. Biol. Chem. 262:6931-6937, 1987.
21. Sato, E.F., Tanaka, Y., Edashige, K., Kobuchi, H., Morishita, S., Sugino, Y.M., Inoue, M., and Utsumi, K. Expression of the cDNA encoding lipocortin-like 39kDa protein of guinea pig neutrophils in yeast. FEBS

Lett.,255:231-236,1989.

22. Rocha, V., and Lozano, J.J. Calcium-dependent membrane binding proteins of the mammary gland. In Stimulus Response Coupling: The Role of Intracellular Calcium-binding Proteins (V.L. Smith, and J.R. Dedman, eds) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp443-465, 1990.
23. Johnsson, N., Van, P.N., Soling, H.-D., and Weber, K. Functionally distinct serine phosphorylation site of p36. EMBO J. 5:3455-3460, 1986.
24. Gould, K.L., Woodgett, J.R., Isacke, C.M., and Hunter, T. The protein-tyrosine kinase substrate, p36, is also a substrate for protein kinase C in vivo and in vitro. Mol. Cell. Biol. 6:2738-2744, 1986.
25. Weber, K., Johnsson, N., Plessmann, U., Nguyen Van, P., Soling, H.-D., Ampe, C., and Vandekerckhove, J. The amino acid sequence of protein II and its phosphorylation site for protein kinase C; the domain structure Ca^{2+} -modulated lipid binding proteins. EMBO J. 6:1599-1604, 1987.
26. Kenton, P., Johnson, P.M., and Webb, P.D. The phosphorylation of p88, a calcium-binding protein associated with the human syncytiotrophoblast submembranous cytoskeleton, is modulated by growth factors, activators of protein kinase C and cyclic AMP. Biochem. Biophys. Act. 1014:271-281, 1989.
27. Kaetzel, M.A., Hazarika, P., and Dedman, J.R. Annexins and the search for function: an immunological first step. In Stimulus Response Coupling: The Role of Intracellular Calcium-binding Proteins (V.L. Smith, and J.R. Dedman, eds). CRC Press, Boca

Raton, Florida, p383-407, 1990.

28. Raeymaekers, L.; Waytack, F., and Casteels, R. Isolation of calelectrin-like proteins associated with smooth muscle membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 132:526-532, 1985.
29. Lui, T., and Jackson, G.L. Stimulation by phorbol ester and diacylglycerol of luteinizing hormone glycosylation and release by rat anterior pituitary cells. Endocrinology, 121:1589-1595, 1987.
30. Audy, M.C., Boucher, Y., and Bonnin, M. Estrogen modulated gonadotropin release in relation to gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) and phorbol ester (PMA) action in superfused rat pituitary cells. Endocrinology, 126:1396-1402, 1990.

総 括

個体の発生や分化、各種ホルモンの分泌とその機能発現において、Cキナーゼは細胞膜を介した情報伝達に重要な役割を果たしている。Cキナーゼは刺激応答に伴う細胞膜リン脂質代謝の活性化によって細胞膜に移行して活性化し、さまざまな基質タンパク質をリン酸化することによって細胞機能を調整している。過去10年以上に渡ってこの酵素の関与する情報伝達機構の解析が精力的に行われたのにもかかわらず、この酵素の活性化がどのような伝達機構を介して細胞機能の発現と結びついているかについては、今なお多くが不明である。

そこでCキナーゼによる情報伝達機構の解明のためのひとつのアプローチとして、Cキナーゼの活性化における細胞質タンパク質の動態に着目し、細胞質タンパク質と細胞膜を構成するリン脂質膜との相互作用について検討した。そしてCキナーゼの活性化物質であるTPAによる細胞の分化や増殖を阻害する物質や、抗エストロゲン剤のCキナーゼ阻害作用について、細胞質タンパク質と細胞膜との相互作用に対する効果から検討を加え、以下の結果を得た。

1. Cキナーゼの活性化と基質タンパク質とリン脂質膜との相互作用

Cキナーゼは、ある種の細胞外からの刺激によるイノシトールリン脂質代謝の亢進と共役して細胞膜に移行し、活性化する。活性化されたCキナーゼは細胞膜に局在することから、その基質タンパク質も細胞膜と相互作用していることが推察される。そこで、Cキナーゼの自己リン酸化をCキナーゼ活性化の指標とし、基質タンパク質のリン酸化とその膜結合量との関係を検

討した。

1. TPA存在下では、 Ca^{2+} 非依存的にもCキナーゼの自己リン酸化が観察された。またこの自己リン酸化は、200 mM NaCl程度の低いイオン強度の上昇には影響されなかった。
2. Histone type IIISとC_{14:0}-lysosomeは、 Ca^{2+} 非存在下にリン酸化を受けたが、Annexin Iは 10^{-4} Mの Ca^{2+} を要求した。これらの基質タンパク質の膜結合性は、Histone type IIISおよびC_{14:0}-lysosomeは Ca^{2+} 非依存的にリン脂膜に結合し、Annexin Iのリン脂質膜への結合には 10^{-5} - 10^{-4} Mの Ca^{2+} が要求された。
3. イオン強度の上昇によってHistone type IIISおよびAnnexin Iのリン酸化は強く阻害されたが、C_{14:0}-lysosomeのリン酸化の阻害は比較的弱かった。Histone type IIISとAnnexin Iのリン脂質膜への結合量は、イオン強度の上昇に伴って著しく減少したが、C_{14:0}-lysosomeでは変化が見られなかった。

以上の結果から、基質タンパク質のリン酸化には、活性化したCキナーゼが局在するリン脂質膜への基質タンパク質の結合が必要であることが強く示唆された。また膜受容体型タンパク質リン酸化酵素の一つであるEGF受容体キナーゼにおいても同様であることも示唆された。

II. TPAによる細胞の分化および増殖に対するCキナーゼ阻害物質の効果とその機構

Cキナーゼの活性化物質であるTPAによってある種の培養細胞が分化することから、細胞の分化にCキナーゼが関与していることが示唆されている。またTPAは強力な発癌プロモーター

でもあることから、Cキナーゼは細胞増殖にも関与していることが示唆されている。そこで、Cキナーゼの関与する細胞分化と増殖における細胞質タンパク質と細胞膜との相互作用の重要性について、それぞれ前骨髄性白血病細胞HL-60のTPAによる分化と、マウス皮膚二段階発癌におけるTPAの発癌プロモーション作用をモデルとして、Cキナーゼ阻害剤を用いて検討した。

HL-60のTPAによる分化に対するCキナーゼ阻害物質の作用を検討し、以下の結果を得た。

1. HL-60のTPAによるマクロファージへの分化に対し、Cキナーゼ阻害物質であるH-7、Sphingosine、TFPはいくつかの分化の指標に対し阻害的に作用するが、Annexin Iの誘導には効果がなかった。
2. これらの阻害剤は、TPAによるPKC β のダウンレギュレーション等Cキナーゼの量的変化を阻害しなかった。
3. これらの阻害物質は、TPAによるPKC β の膜への移行を阻害しなかった。このためカルパインによるPKC β の分解が阻害されなかったものと推察された。これらの結果から、Cキナーゼの関与する分化には、Cキナーゼの活性化のみならず、Cキナーゼやカルパインの細胞質から細胞膜への移行が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

Cキナーゼ阻害物質の一つであるCepharanthineのTPAの発癌プロモーションに対する阻害効果について検討し、以下の結果を得た。

1. CepharanthineはCキナーゼによるHistoneのリン酸化を阻害するが、Cキナーゼの自己リン酸化は阻害せず、Cキナーゼの活性化そのものを阻害しないことが示唆された。
2. Cepharanthineは、H1 histoneのPSに依存したリン脂質膜へ

の結合を阻害し、その濃度依存性はリン酸化阻害のそれとよく平行していた。

3. 皮膚上皮細胞質タンパク質の内在性Cキナーゼによるリン酸化に対しては、Cepharanthineは一部のタンパク質のリン酸化は阻害したが、阻害されないタンパク質や、反ってリン酸化が促進されるタンパク質もあった。

以上の結果から、Cキナーゼの関与する細胞の分化および増殖において、特定のCキナーゼの基質タンパク質と細胞膜との相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。

III. 非ステロイド系抗エストロゲン剤によるCキナーゼ活性の阻害とその機構

ClomipheneとTamoxifenはエストロゲンの拮抗阻害物質であるが、Cキナーゼ阻害作用も有している。そこでその作用機構を検討し、以下の結果を得た。

1. 両物質ともCキナーゼによるHistone type IIISおよびAnnexin Iのリン酸化を阻害したが、基質タンパク質によってKi値が著しく異なっていた。
2. Tamoxifenは、Histone type IIISおよびAnnexin Iのリン脂質膜への結合を阻害し、その濃度依存性はそれぞれのリン酸化阻害のそれとよく平行していた。これらの結果から、これらの物質のCキナーゼ阻害機構が、基質タンパク質のリン脂質膜への結合を阻害することによることが示唆された。
3. 乳腺と子宮の細胞質タンパク質の内在性Cキナーゼによるリン酸化に対して、両物質とも阻害的に作用したが、一部のタンパク質のリン酸化は阻害しなかった。またその濃度依存性は、Histone type IIISのリン酸化阻害のそれより Annexin Iに近いことから、in vivoでは、従来考えられていた両物質

のCキナーゼ阻害濃度よりかなり低い濃度で特定の細胞質タンパク質のリン酸化を阻害している可能性が示唆された。

これらの結果から、従来エストロゲンとの拮抗作用のみで説明されてきた抗エストロゲン剤のいくつかの作用についても、Cキナーゼ阻害作用が関与している可能性が示唆された。

糸吉 言

ホルモンや増殖因子等生体内で生産される情報伝達物質は、標的組織の細胞に情報を伝達し、その細胞機能を発現させることによって個体の生存に都合の良い状態を作り出す。生殖生理においても、発生や分化、各生殖器官の成長や性周期のタイミングの決定、妊娠の維持および出産や哺乳等広い領域に関与している。そのため情報伝達物質の伝達機構の解明は、生殖生理学の上でも非常に重要である。

本研究では、特に細胞膜のリン脂質代謝と共役して細胞内の情報伝達に関与するCキナーゼに焦点をあて、情報伝達機構解明のひとつアプローチとして細胞質タンパク質と細胞膜との相互作用の役割について検討した。そして細胞質タンパク質と細胞膜との相互作用が、Cキナーゼの情報伝達手段である基質タンパク質のリン酸化に不可欠であることを明らかにした。そしてCキナーゼによる情報伝達の制御には、Cキナーゼの活性化だけではなく、おそらく細胞の刺激応答に伴う一連の反応、たとえば細胞内 Ca^{2+} の上昇、細胞膜の流動性の増加、細胞膜の脱分極、細胞内pHの上昇等によって変化する細胞質タンパク質と細胞膜との相互作用によっても制御されていることが示唆された。これらの結果は、生殖生理学のみならず一般生理学においても、生体内での情報伝達の機構を解明する上で、新たな視点を与えるものである。

謝 辞

本研究について、暖かい御教示と本論文をまとめる機会を賜った京都大学農学部畜産学科家畜繁殖学教授、入谷明博士に深甚の謝意を表す。

本研究に進めるに当り、終始御指導と御助言を頂いた高知医科大学医学部生物学教授、内海耕慥博士に感謝の意を表す。

本研究を行うに当り終始御協力頂いた高知医科大学医学部附属動物実験施設助教授、古谷正人博士、高知医科大学医学部薬理学教授、大隅義継博士、高知医科大学医学部精神神経学教授、池田久男博士、高知大学農学部農芸化学科生物および栄養化学教授、山本晋平博士、高知大学農学部暖地農学科畜産学助教授、葛西孫三郎博士、京都大学農学部畜産学科家畜繁殖学助教授、内海恭三博士および高知医科大学医学部附属動物実験施設の皆様に厚く御礼申し上げる。

実験遂行にあたり御助言、御協力頂いた福山大学工学部内海生物資源研究所講師、沖増英治博士、高知医科大学医学部生物学助教授、宮原正信博士、同佐藤英介博士、同秋丸国広博士、高知医科大学医学部麻酔蘇生学、土屋正彦博士、同友田三保博士、大鵬薬品工業徳島研究所、昇公一博士、山口大学農学部農芸化学科生物化学教授、井出明雄博士、同内海俊彦博士、高知医科大学医学部附属病院薬剤部主任、岩田真氏に心から感謝する。稿作製にあたり御協力いただいた高知医科大学医学部生物学、秋丸陽子嬢、岡西妙子嬢、森由加嬢に謝意を表す。